

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS**  
**MOLECULARES**



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS**  
**INMUNOPATOLÓGICOS EN LIPODISTROFIAS**  
**ADQUIRIDAS DE TIPO PARCIAL Y GENERALIZADO**

**TESIS DOCTORAL**

**Fernando Corvillo Rodríguez**

**Madrid, 2018**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
INMUNOPATOLÓGICOS EN LIPODISTROFIAS  
ADQUIRIDAS DE TIPO PARCIAL Y GENERALIZADO**

**Memoria presentada por Fernando Corvillo Rodríguez, Licenciado en  
Biología, para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares**

**Directora: Dra. Margarita López Trascasa**

**Unidad de Inmunología**  
**Hospital Universitario La Paz**  
**Madrid, 2018**

## Agradecimientos

Lo primero de todo agradecer a la Dra. Margarita López Trascasa que haya confiado en mí durante todos estos años. Gracias por haberme dado la oportunidad de contribuir al precioso y apasionante campo de la investigación Biomédica.

La culminación de este trabajo es el fin de una etapa, la cual ha sido una de las mejores de mi vida. Durante estos años he conocido a gente maravillosa. Cuando llegué con 23 años a la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario La Paz, nunca me imaginé crecer tanto como persona. Haber formado parte de esa familia me congratula, y aunque ya no esté allí, siempre llevaré esta etapa y a su gente en mi corazón. Alberto, Pili, Ana, Yadira, Borja, Lucía, Argentina, María, Alejandro, Juan Torres, Juan Valdivieso, Vero, Carla, Bea, Leo: chicos y chicas, gracias de todo corazón por los buenos momentos que hemos pasado. A los técnicos de la Sección de Inmunoquímica, Sofía, Gracia y Elena: gracias por escucharme, por ayudarme y aconsejarme siempre; mil gracias. Gracias al resto de técnicos (Cristina, Susana, Begoña, Paqui, Dani...) con los que he compartido risas y buenos momentos. A los adjuntos de la Unidad de Inmunología, a los que están, a los que acaban de llegar, y a los que por desgracia ya no están; gracias por ser una fuente de sabiduría para mí.

Gracias a los familiares y afectados de lipodistrofias, pues sin vosotros nada de esto sería realidad. Esperamos que nuestros hallazgos sean relevantes para curar vuestra enfermedad.

De esta etapa me llevo lo más importante: haber conocido a mi compañera de vida, mi esposa, Karina. Sin duda, ha sido la mejor casualidad que me podía pasar. Gracias, Karina, por tu apoyo incondicional, por comprenderme y por aguantarme durante la elaboración de esta tesis. Gracias por darme la oportunidad de formar una familia, gracias por darme ese regalo.

Y por supuesto no me olvido del resto de mi familia. Gracias papá y mamá por vuestro esfuerzo y apoyo, sin vosotros no estaría escribiendo estas líneas. Gracias Miri por sentirte orgullosa de mí y gracias por haber traído al mundo a “mi Alma”, la cual se ha llevado parte de mi corazón desde el momento en que la vi.

GRACIAS de todo corazón a todos y a todas, y perdón a los que olvido, igualmente os agradezco vuestra presencia en esta etapa

# **RESUMEN/ABSTRACT**

## RESUMEN

Las lipodistrofias son un conjunto heterogéneo de patologías ultra-raras (1:1.000.000) caracterizadas por el déficit específico de tejido adiposo en ausencia de privación nutricional o estado catabólico. La patogenia de las lipodistrofias adquiridas de tipo parcial (LPA o síndrome de Barraquer-Simons) y generalizado (LGA o síndrome de Lawrence), tiene un componente inmunológico, aunque el mecanismo se desconoce. Por un lado, la LPA se caracteriza por la desregulación de la vía alternativa del complemento, lo que ha llevado a proponer que ocurre una lisis del adipocito mediante un mecanismo dependiente del complemento. En la LGA, sin embargo, las evidencias apuntan a la destrucción del tejido adiposo debido a la existencia de anticuerpos dirigidos contra el tejido adiposo. Por ello, en este trabajo se planteó como objetivo principal la caracterización de los mecanismos inmunológicos implicados en la patogenia de ambas lipodistrofias. Para conseguirlo se propuso: 1) profundizar en el estudio del perfil plasmático del complemento y la aparición de anticuerpos que producen la desregulación del mismo; y 2) analizar la presencia de anticuerpos específicos contra el tejido adiposo y caracterizarlos en caso de que existieran.

Un 75% de los pacientes con LPA presentaron un descenso significativo de los niveles de C3. Además se midieron los niveles plasmáticos de C3adesArg, una potente adipoquina implicada en el metabolismo lipídico, encontrándose elevados. En todos los pacientes con alteraciones del complemento se detectaron anticuerpos relacionados con la desregulación del complemento, como factor nefrítico de C3 (C3NeF) o anticuerpos contra componentes y reguladores de la vía alternativa del complemento, como C3, factor B, properdina, factor H y factor I. Por otra parte, la oportunidad de estudiar la evolución del perfil del complemento en un paciente con LPA ha puesto de manifiesto su posible utilidad como biomarcador para el progreso de la lipodistrofia.

En este trabajo se ha descrito un autoanticuerpo relacionado con la pérdida del tejido adiposo en pacientes con LGA. Este anticuerpo reconoce la proteína perilipina-1, muy presente en el tejido adiposo blanco, y con un papel clave en el control de la vía lipolítica. Los estudios *in vitro* en adipocitos en cultivo han evidenciado que en presencia de estos anticuerpos se produce un incremento significativo de la lipólisis basal, tal y como le ocurre a los pacientes con lipodistrofia parcial familiar con mutaciones en esta proteína.

# ABSTRACT

The lipodystrophies are a heterogeneous group of ultra-rare (1:1.000.000) disorders that have in common selective deficiency of adipose tissue in the absence of nutritional deprivation or catabolic state. The pathogeny of the acquired partial lipodystrophy (APL or Barraquer-Simons syndrome) and acquired generalized lipodystrophy (AGL or Lawrence syndrome) have an immunological component, whose relationship with the disease has not been established. APL is characterized by complement system abnormalities and the fat loss mechanism proposed is a complement dependent lysis of adipocytes. However, in AGL it is hypothesized that destruction of adipocytes could be due to either a cell-mediated or an antibody-mediated autoimmune process or both. Thus, in this thesis we raised the study of immunopathological mechanism in both diseases as principal objective. To achieve it, we raised: 1) to deepen in the study of plasmatic complement profile and the presence of antibodies that dysregulate it; and 2) to analyze the existence of autoantibodies against adipose tissue and characterize, if there are found.

Seventy-five percent of APL patients had a significantly C3 consumption. As a novelty, plasma levels of C3adesArg (an important adipokine involved in lipid metabolism) were measured, which were found increased. All patients with complement abnormalities in turn carried autoantibodies like C3 nephritic factor (C3NeF) or others against complement components and regulators (C3, factor B, properdin, factor H and factor I). Moreover, the monitoring of the complement profile during the time in one APL patient revealed its relevance as biomarker of the progression of lipodystrophy.

In this investigation it has been defined novel pathogenic autoantibodies that explain the loss of adipose tissue in some AGL patients. These antibody recognizes perilipin-1 protein, highly expressed in white adipose tissue, and with a key role in the control of lipolytic pathway. *In vitro* studies have shown that perilipin-1 autoantibodies induced a significantly increased of basal lipolysis in cultured adipocytes, as too happens in familial partial lipodystrophy patients with mutation in this protein.

# ÍNDICE

---

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
1.1. El tejido adiposo.....	13
1.1.1. Tipos y principales funciones. ....	14
1.1.2. Componentes celulares del tejido adiposo.....	15
1.1.3. Localización anatómica. ....	17
1.2. Gotas lipídicas.....	18
1.2.1. Biogénesis de gotas lipídicas. ....	19
1.2.2. Proteínas de la cubierta lipídica.....	20
1.3. Metabolismo de las grasas en el tejido adiposo: lipogénesis <i>versus</i> lipólisis.....	21
1.3.1. Lipogénesis.....	21
1.3.2. Lipólisis .....	22
1.4. El papel del sistema del complemento en el tejido adiposo. ....	24
1.4.1. El sistema del complemento .....	24
1.4.2. El sistema del complemento y el metabolismo lipídico. ....	26
1.5. Lipodistrofias .....	28
1.5.1. Concepto y clasificación.....	28
1.5.2. Lipodistrofias adquiridas: .....	29
1.5.2.1. Lipodistrofia parcial adquirida (síndrome de Barraquer-Simons) .....	29
1.5.2.2. Lipodistrofia generalizada adquirida (síndrome de Lawrence) .....	31
1.5.2.3. Lipodistrofia localizada inducida por fármacos.....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Material Biológico.....	39
3.1.1. Poblaciones de estudio. ....	39
3.1.2. Obtención de muestras de suero. ....	39
3.1.3. Obtención de muestras de tejido adiposo humano. ....	39
3.2. Técnicas de cultivos celulares. ....	40
3.2.1. Dispersión de tejido adiposo y obtención de fracción estroma vascular. ....	40
3.2.2. Cultivo y diferenciación adipogénica de células mesenquimales humanas. ....	40
3.2.3. Cultivo y diferenciación adipogénica de la línea celular 3T3-L1. ....	41
3.3. Estudios en Western Blot.....	42
3.3.1 Obtención de extractos proteicos. ....	42
3.3.2. Electroforesis y electrotransferencia. ....	43
3.3.3. Inmunodetección. ....	44
3.3.4. Bloqueo peptídico .....	45
3.3.5. Listado de los anticuerpos utilizados en las técnicas de Western blot. ....	45



3.4. Estudios de localización mediante inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. ....	46
3.4.1. Inmunofluorescencia de cortes de tejido adiposo. ....	46
3.4.2. Inmunofluorescencia de adipocitos de ratón y humanos. ....	46
3.4.3. Listado de los anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. ....	47
3.5. Técnicas de inmunoquímica. ....	47
3.5.1. Estudio bioquímico de proteínas del complemento. ....	47
3.5.2. Detección de anticuerpos frente a componentes de la vía alternativa: C3, factor B, properdina, factor I y factor H. ....	48
3.5.3. Ensayo de microplacas para la detección de factor nefrítico de C3 (C3NeF). ....	49
3.5.4. Detección de anticuerpos frente a perilipina-1. ....	49
3.5.5. Listado de los anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunoquímica. ....	50
3.6. Determinación de la actividad lipolítica celular en células 3T3-L1. ....	50
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS .....	55
4.2. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN PACIENTES CON LIPODISTROFIAS ADQUIRIDAS .....	57
4.2.1. Estudio del perfil plasmático de componentes del complemento .....	57
4.2.2. Detección de autoanticuerpos dirigidos frente a componentes de la vía alternativa del complemento .....	59
4.2.3. Seguimiento del perfil del sistema del complemento en un paciente con LPA: a propósito de un caso. ....	60
4.3. AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL TEJIDO ADIPOSO .....	61
4.3.1. Detección de autoanticuerpos .....	61
4.3.1.1. Caracterización inmunológica de los autoanticuerpos dirigidos frente al tejido adiposo. .....	61
4.3.1.1.1. Obtención de extractos de tejido adiposo subcutáneo humano. ....	61
4.3.1.1.2. Antigenicidad del extracto de tejido adiposo humano. ....	61
4.3.1.1.3. Estrategia para el estudio de la localización del antígeno. ....	63
4.3.1.1.4. Identificación del antígeno. ....	65
4.3.1.1.4.1. Selección de los candidatos más adecuados. ....	65
4.3.1.1.4.2. Identificación de la proteína perilipina-1 en extractos de tejido adiposo. ....	68
4.3.1.1.4.3. Estudios de especificidad de los autoanticuerpos. ....	68
4.3.1.1.4.4. Colocalización de la IgG humana anti-perilipina-1 y de perilipina-1 en adipocitos en cultivo. ....	69
4.3.2. Frecuencia de los anticuerpos anti-perilipina-1 .....	71
4.3.3. Análisis del efecto patogénico de los autoanticuerpos anti-perilipina-1. ....	72
4.3.3.1. Diferenciación de la línea de ratón 3T3-L1 en células adiposas. ....	72
4.3.3.2. Antigenicidad de extractos de tejido adiposo de ratón. ....	73
4.3.3.3. Antigenicidad de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. ....	73
4.3.3.4. Medida de la actividad lipolítica en presencia de autoanticuerpos dirigidos contra perilipina-1. ....	74
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>79</b>

<b>5.1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN PACIENTES CON LIPODISTROFIAS ADQUIRIDAS .....</b>	<b>79</b>
5.1.1. Estudio del perfil plasmático de componentes del complemento. ....	79
5.1.2. Autoanticuerpos dirigidos frente a componentes de la vía alternativa del complemento. ...	81
5.1.3. Seguimiento del perfil del sistema del complemento en un paciente con LPA: a propósito de un caso. ....	83
<b>5.2. AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL TEJIDO ADIPOSO .....</b>	<b>85</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>118</b>

# **CLAVE DE ABREVIATURAS**

## CLAVE DE ABREVIATURAS

<b>ACAT</b>	Acil-CoA:colesterol aciltransferasas
<b>ACSL3</b>	Acil-CoA sintetasa de cadena larga 3
<b>ADRP</b>	Proteína relacionada con la diferenciación adipogénica o adipofilina
<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>AMPc</b>	AMP cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASP</b>	Proteína estimulante de la acilación o C3adesArg
<b>ATGL</b>	Triglicérido lipasa adiposa
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>CCT</b>	CTP:fosfocolina citidiltransferasa
<b>CGI-58</b>	<i>Comparative Gene Identification-58</i>
<b>cPLA2<math>\alpha</math></b>	Fosfolipasa A2 citosólica de Grupo IVA
<b>DGAT</b>	Diacilglicerol aciltransferasa
<b>DMEM</b>	Dulbbeco's Modified Eagle's Medium
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetra-acético
<b>FB</b>	Factor B
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FD</b>	Factor D o adipsina
<b>FH</b>	Factor H
<b>FI</b>	Factor I
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico
<b>hMSC</b>	Células madre mesenquimales humanas
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>IBMX</b>	Isobutilmetilxantina
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>KO</b>	Knockout

<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>LFP</b>	Lipodistrofia familiar parcial
<b>LGA</b>	Lipodistrofia generalizada adquirida
<b>LGC</b>	Lipodistrofia generalizada congénita
<b>LINS</b>	Lipoatrofia por inyección intradérmica de insulina
<b>LPA</b>	Lipodistrofia parcial adquirida
<b>LPCAT</b>	Lisofosfatidilcolina aciltransferasas
<b>MSC</b>	Célula madre mesenquimal
<b>NCS</b>	Suero bovino del recién nacido
<b>P</b>	Properdina
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PDE3</b>	Fosfodiesterasa 3
<b>PET</b>	Tomografía de emisión de positrones
<b>PKA</b>	Proteína kinasa A
<b>PKG</b>	Proteína kinasa G
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SHN</b>	Suero humano normal
<b>SHUa</b>	Síndrome Hemolítico Urémico atípico
<b>SVF</b>	Fracción de estroma vascular
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TAP</b>	Tejido adiposo pardo
<b>TBS</b>	Tris Buffer Salino
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TIP47</b>	<i>Tail-Interacting Protein</i> de 47 KDa

## ***Claves de abreviaturas***

---

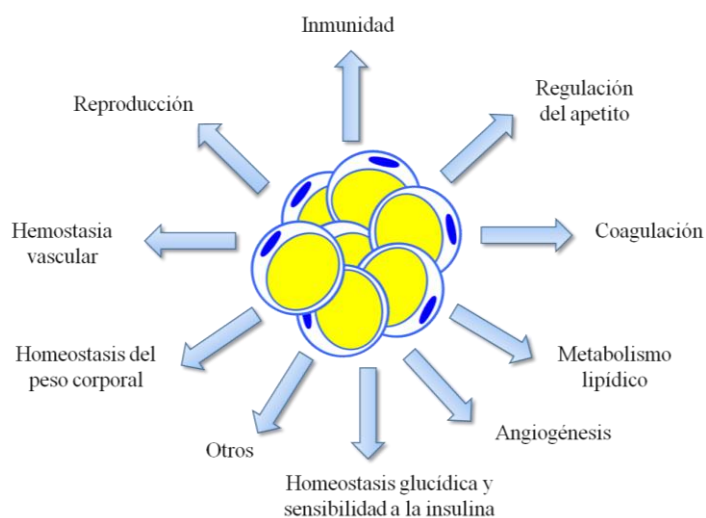
**UCP-1**      *Uncoupling Protein-1*

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El tejido adiposo.

Es un tejido conjuntivo, de origen mesodérmico, altamente especializado en el almacenaje energético donde predomina un tipo celular de origen epitelial denominado **adipocito**. En condiciones normales el tejido adiposo representa un 15-20% del peso corporal del hombre, y entre el 20-25% del peso de la mujer. Durante mucho tiempo, el tejido adiposo ha sido considerado como un tejido metabólicamente inactivo. Sin embargo, en la actualidad se sabe que el tejido adiposo controla el metabolismo lipídico a través de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas, que le permiten regular el metabolismo tanto en adipocitos como en otros tipos celulares del sistema nervioso central, hígado, músculo y páncreas (Choe *et al.*, 2016). Los adipocitos del tejido adiposo son los encargados de almacenar la energía en forma de triglicéridos (TG) en orgánulos intracelulares especializados, **las gotas lipídicas**. Cuando se necesita energía, los TG son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos (AG) resultantes salen del adipocito y son transportados hasta otros tejidos donde son utilizados (Luo y Lui, 2016).



**Figura 1. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el tejido adiposo mediante la secreción de adipocinas** (Imagen adaptada de Trayhurn, 2013).

Por otra parte, tras el descubrimiento de la leptina en 1990 (Zhang *et al.*, 1994) se empezó a considerar el tejido adiposo como un verdadero órgano endocrino. Así, hoy en día se conoce que dicho tejido secreta, además de leptina, una gran variedad de hormonas y citoquinas con actividad biológica, genéricamente conocidas como



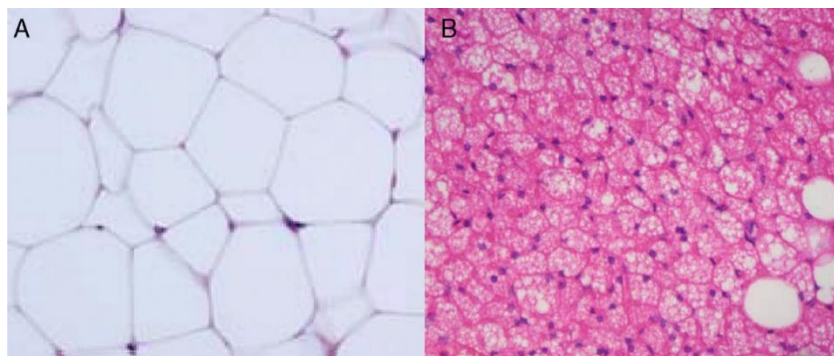
adipoquinas (Fasshauer *et al.*, 2015). Estas moléculas actúan regulando el metabolismo energético en otros tejidos como hígado y músculo, y además presentan funciones específicas en procesos como inmunidad, inflamación y reproducción (Trayhurn, 2013; Guilherme *et al.*, 2008) (Figura 1).

### **1.1.1. Tipos y principales funciones.**

En los mamíferos, existen dos tipos principales de tejido adiposo, el **tejido adiposo blanco (TAB)** y el **tejido adiposo pardo (TAP)**, los cuales se diferencian tanto en su composición como en su función biológica.

Los adipocitos del TAB son células que contienen una única vesícula de lípidos (unilocular) que llega a ocupar el 90% del volumen celular, lo que hace que el núcleo sea aplanado y se localice en la periferia (Figura 2a). Las dos principales funciones del TAB son el almacenamiento de energía en forma de TG y ésteres de colesterol, en gotas uniloculares, y su liberación en forma de AGs. Este hecho hace que el TAB sea el principal tejido de almacenamiento energético en el ser humano. Además de estas funciones, este tejido constituye por su naturaleza maleable un soporte adaptativo contra presiones y agresiones mecánicas que podrían degradar los órganos que recubre y protege, como son los riñones, ganglios linfáticos u ojos, y el relleno ideal para la repartición física del peso en zonas periféricas, las grandes articulaciones y las palmas de pies y manos. Representa también la masa que confiere turgencia y plasticidad a aquellos órganos que se ven sometido a variaciones importantes en el volumen, como son los pechos de la mujer, y juega un importante papel en el equilibrio hídrico y como aislante térmico (Choe *et al.*, 2016). Otro papel muy relevante por el que destaca el TAB es su función como órgano endocrino, a diferencia del protagonismo prácticamente marginal del TAP en este aspecto (Kajimura, 2017).

El TAP está formado por adipocitos que contienen abundantes vesículas de grasa (multilocular) rodeadas de un gran número de mitocondrias, las cuales le confieren su característico color marrón (Figura 2b). A nivel molecular se caracteriza por la elevada expresión de la proteína desacoplante UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*). UCP-1 es una proteína que al ser activada por AGs de cadena larga, permite la generación de calor mediante el desacoplamiento de la cadena respiratoria de la producción de ATP. Esto pone de manifiesto que la principal función del TAP es, por tanto, la termogénesis, esto es, la producción de calor y la homeostasis térmica (Sanchez-Gurmaches *et al.*, 2016).



**Figura 2. Imagen con microscopio óptico de tejido adiposo blanco (A) y tejido adiposo pardo (B)** (Imagen adaptada de Esteve Ràfols, 2014)

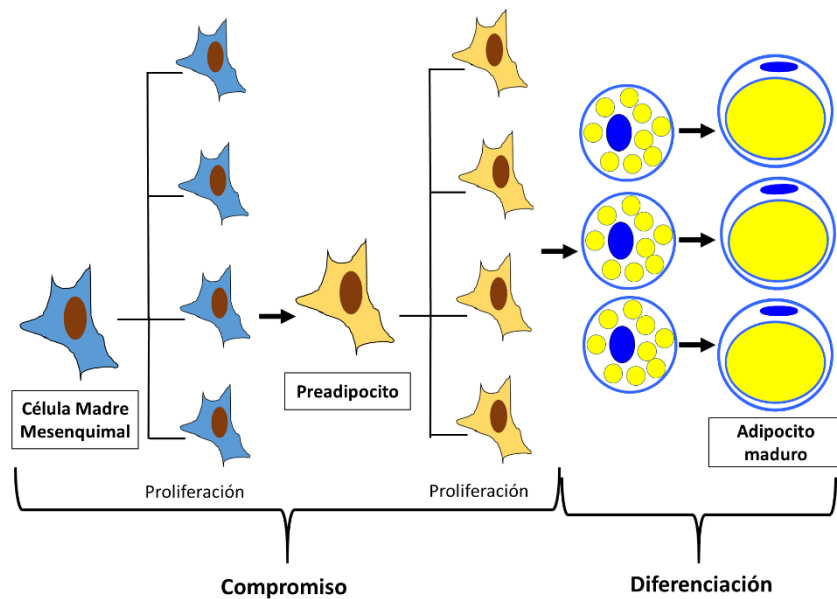
### 1.1.2. Componentes celulares del tejido adiposo.

El tejido adiposo es muy heterogéneo tanto a nivel de composición celular como en cuanto a su localización anatómica. Así, éste está compuesto por adipocitos maduros inmersos en una matriz de colágeno donde también residen células madre mesenquimales (MSC), preadipocitos, terminales nerviosos, células sanguíneas y tejido vascular, que en conjunto se denomina **fracción de estroma vascular (SVF)** (Frayn *et al.*, 2003). Ambos componentes, adipocitos maduros y SVF, son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo y, en consecuencia, ambos participan en la alteración del metabolismo glucídico y lipídico y en la producción y liberación de adipoquinas.

Los **adipocitos** son las células más abundantes dentro del tejido adiposo, constituyendo el 25% del número total de células. Son células esféricas y de tamaño muy variable que oscila entre 20 y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas células acumulan energía en forma de triglicéridos, diacilglicerol, fosfolípidos, AGs no esterificados y colesterol, los cuales son almacenados en el interior de orgánulos altamente especializados, las gotas lipídicas.

Adicionalmente, entre los componentes de la fracción de estroma vascular se encuentran **las células madre mesenquimales (MSC)** y **preadipocitos**, que darán lugar a la renovación de las células maduras del tejido (MacDougald y Mandrup, 2002; Rodeheffer *et al.*, 2008), un proceso que, según se ha demostrado en un estudio reciente (Spalding *et al.*, 2008), se mantiene en el adulto, tanto en individuos delgados como obesos. Este proceso recibe el nombre de adipogénesis, el cual se divide en dos fases: la primera, conocida como **compromiso**, comprende el paso de la célula madre

pluripotente hacia la línea celular de adipocito. Aunque no se conoce bien el número exacto de etapas entre una MSC y un adipocito maduro, se cree que la MSC da lugar a un primer precursor común, el adipoblasto, que origina preadipocitos blancos y pardos comprometidos; éstos, a su vez, bajo condiciones estimuladoras adecuadas se diferencian en adipocitos maduros de diferentes tipos. Llegado a este punto concluye la fase de compromiso. En la segunda fase, conocida como **diferenciación terminal** del adipocito o propiamente adipogénesis, los preadipocitos se replican para incrementar el número de adipocitos, los cuales posteriormente van a ir llenándose de lípidos, pasando a ser células de aspecto esférico (Figura 3), en las que se detiene permanentemente el ciclo celular y funcionalmente son adipocitos maduros (Hausman *et al.*, 2001). La diferenciación va acompañada por dramáticas alteraciones en la forma de la célula, así como cambios moleculares que conducen a un marcado incremento en la capacidad de la célula para sintetizar lípidos y para la respuesta hormonal específica, permitiendo al adipocito asumir su papel especializado en la homeostasis de la energía (Ailhaud *et al.*, 1992; Gregoire *et al.*, 2001).



**Figura 3. Adipogénesis: proliferación y diferenciación.** (Adaptada de Avram *et al.*, 2007)

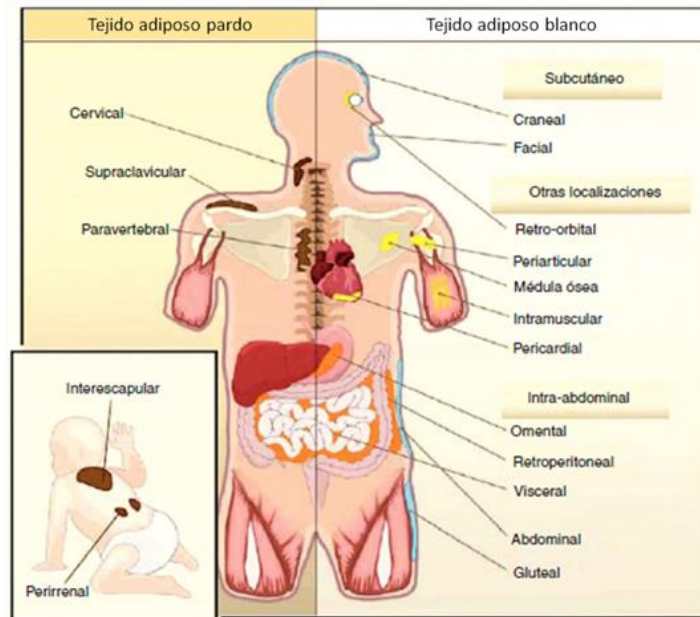
Por otro lado, entre las células sanguíneas presentes en tejido adiposo abundan los **monocitos** y **macrófagos**. En individuos delgados, los macrófagos de tejido adiposo se caracterizan por presentar una elevada expresión de genes anti-inflamatorios y una elevada capacidad de reparación tisular y angiogénesis (Kershaw y Flier, 2004). Sin embargo, en obesidad el número de macrófagos en tejido adiposo aumenta debido a una

mayor infiltración de este tipo celular desde los vasos sanguíneos (Xu *et al.*, 2003), lo que está asociado con un aumento de la secreción de factores inflamatorios (Riordan *et al.*, 2009), como TNF- $\alpha$  e IL-6. Estos factores modifican la permeabilidad vascular, dando lugar a un aumento en la infiltración de monocitos y la acumulación de macrófagos en el tejido, perpetuando el ambiente inflamatorio (Shoelson *et al.*, 2007).

### **1.1.3. Localización anatómica.**

En los mamíferos hay dos depósitos mayoritarios de TAB: la **grasa subcutánea**, que se sitúa principalmente bajo la piel, especialmente en muslos, nalgas y abdomen; y la **intra-abdominal**, que comprende la grasa perirrenal, mesentérica y omental. Pero además de estos depósitos mayoritarios existen otras áreas en el organismo donde encontramos TAB, distinguiendo depósitos a nivel pericardial, perivascular o periarterial, periarticular, retro-orbital, intramuscular, médula ósea y cara (Berry *et al.*, 2013; Gesta *et al.*, 2007) (Figura 4). La distribución del TAB varía con la edad, redistribuyéndose entre diferentes depósitos conforme avanza el tiempo, especialmente durante y después de la mediana edad, desde los depósitos subcutáneos a los viscerales (intra-abdominales), y esto es así incluso en individuos con peso e índice de masa corporal (IMC) estable (Esteve Ràfols, 2014). En los seres humanos, los patrones de distribución de grasa corporal son sexualmente dimórficos (Gesta *et al.*, 2007). Respecto a la topografía, los hombres normalmente se caracterizan por un patrón de grasa corporal central, con acumulación adiposa en la región abdominal, mientras que las mujeres generalmente presentan un patrón de grasa corporal periférico, con una mayor proporción de tejido adiposo en las regiones glútea y femoral (Wells *et al.*, 2007; Siervogel *et al.*, 2003; Van Loan *et al.*, 1996).

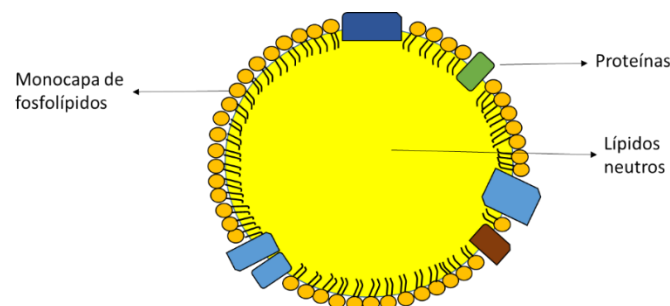
En los fetos y recién nacidos humanos, el TAP se encuentra en regiones axilares, cervical, interescapular, perirrenal y periadrenal (Figura 4), pero disminuye rápidamente después del nacimiento y ha sido tradicionalmente considerado insignificante en adultos (Cannon *et al.*, 2004). Sin embargo, recientes estudios morfológicos y de tomografía axial computarizada y tomografía de emisión de positrones (PET) han demostrado que la grasa marrón en adultos es viable y funcional, la cual se mantiene a lo largo de toda la vida, en proporciones que varían según la edad y con localización periescapular (Van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Nedegaard *et al.*, 2007).



**Figura 4. Distribución corporal del TAB y del TAP en humanos** (Imagen adaptada de Gesta *et al.*, 2007)

### 1.2. Gotas lipídicas

Las **gotas lipídicas** son unos orgánulos citoplasmáticos especializados en el almacenamiento de energía en forma de lípidos neutros, como TG o ésteres de colesterol. Son orgánulos ubicuos altamente conservados, presentes en animales, plantas, hongos e incluso bacterias (Murphy *et al.*, 2001). La gota lipídica está compuesta por un núcleo central rico en lípidos neutros, rodeado por una monocapa de fosfolípidos la cual contiene ciertas proteínas, algunas de las cuales están implicadas en el metabolismo lipídico (Walther *et al.*, 2012; Thiam *et al.*, 2013). En la figura 5 se muestra la organización estructural típica de una gota lipídica.



**Figura 5. Estructura de una gota lipídica.** Las gotas lipídica están formadas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas que rodea un núcleo donde se almacenan lípidos neutros (adaptada de Walther *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Biogénesis de gotas lipídicas.

Como punto de partida, la formación de la gota lipídica ha de ser estudiada en términos de la síntesis de sus componentes mayoritarios: los TGs y los ésteres de colesterol. Estos lípidos neutros son sintetizados de forma terminal en las membranas del retículo endoplásmico (RE) liso por las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGAT) y acil-CoA:colesterol aciltransferasas (ACAT), donde se encuentran distribuidas homogéneamente, en respuesta a distintos estímulos como una sobrecarga de AGs, estrés de retículo o activación celular (Wilfling *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2016; Walther *et al.*, 2017). Para ello, pueden tomar AGs provenientes de varios orígenes, por ejemplo de fuentes exógenas como las lipoproteínas del plasma o de fuentes endógenas como otros lípidos celulares (Hashemi *et al.*, 2015; Wilfling *et al.*, 2014). Una vez sintetizados, los lípidos neutros son secuestrados entre las dos capas de la membrana del RE, que les proporciona un ambiente hidrofóbico (Figura 6, **paso 1**). Las bicapas fosfolipídicas pueden acomodar hasta un 3% de TG y un 5% de ésteres de colesterol (en porcentaje molar) antes de que la acumulación se haga termodinámicamente desfavorable y la fase de lípidos neutros acumulados se separe formando microdominios esféricos de unos 25-28 nm de diámetro que permanecen encajados entre las dos capas de la membrana del retículo (Thiam *et al.* 2013; Xu *et al.*, 2017). Esos microdominios son probablemente los precursores de las gotas lipídicas que posteriormente son liberados desde el RE hacia el citoplasma tras una serie de cambios en la composición de la membrana del retículo altamente regulados que, acompañados de la síntesis de nuevos fosfolípidos, lípidos neutros y proteínas asociadas, favorecen el nacimiento del orgánulo (Penno *et al.*, 2013; Thiam *et al.*, 2013; Walther *et al.*, 2017) (Figura 6, **paso 2**).

A continuación, las dos caras de la membrana de RE se van separando por la excesiva acumulación de lípidos. Una vez que el orgánulo ha crecido, la monocapa se curva intensamente hasta que se cierra completamente para ser liberada al citoplasma, donde inicialmente mantiene una cierta conexión con las membranas del RE, antes de madurar y migrar hacia posiciones más centrales en la célula (Wilfling *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2017) (Figura 6, **paso 3**). En este proceso la gota lipídica naciente va reclutando proteínas accesorias durante su biosíntesis que ayudan a su estabilización, control de la lipólisis y reclutamiento de otras proteínas, aunque las funciones de algunas de ellas continúan sin estar del todo despejadas (Pol *et al.*, 2014;

Walther *et al.*, 2017). El proceso de biogénesis de la gota lipídica viene detallado en la figura 6.

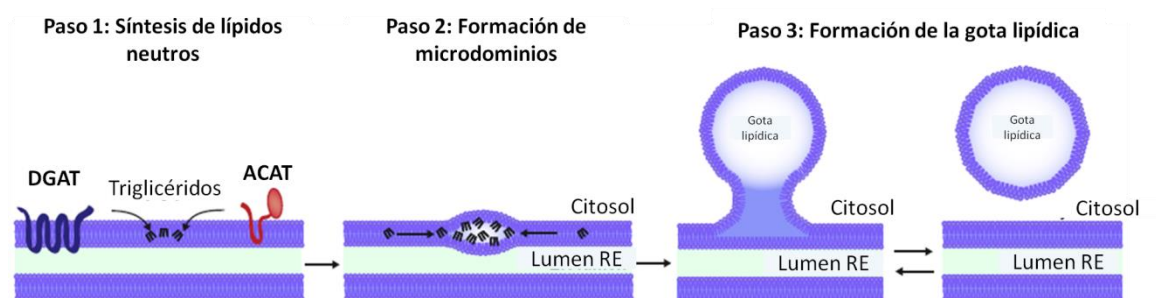


Figura 6. Etapas de la biogénesis de la gota lipídica (Adaptada de Wilfling *et al.*, 2014)

### 1.2.2. Proteínas de la cubierta lipídica.

Las distintas proteínas que se encuentran asociadas a las gotas lipídicas juegan importantes papeles en su biosíntesis y degradación, así como en el tráfico y movilización de sus lípidos. Entre las proteínas que se encuentran íntimamente asociadas a las gotas lipídicas destaca la llamada **familia PAT**, que incluye la **Perilipina**, la proteína relacionada con la diferenciación adiposa (**ADRP** o Adipofilina) y **TIP47** (*Tail-Interacting Protein* de 47 KDa) (Brasaemle *et al.*, 2007). La perilipina fue la primera proteína de esta familia en describirse y es la más estudiada (Greenberg *et al.*, 1991). Su nombre proviene del griego *perilipos*, que significa “que rodea a la grasa” y su función es precisamente actuar como encofrado para estabilizar las gotas lipídicas y proteger su núcleo de lípidos neutros de la acción de las lipasas. Por tanto, la función de esta proteína es clave en el control de la lipólisis, especialmente en adipocitos (Kimmel y Sztalryd, 2016; Itabe *et al.*, 2017; Sztalryd y Brasaemle, 2017). Existen tres isoformas para perilipina generadas por splicing alternativo: A, B y C. Las isoformas A y B se expresan en adipocitos mientras que la C se expresa principalmente en células esteroideogénicas (Fujimoto *et al.*, 2008). La proteína relacionada con la diferenciación adiposa o adipofilina, también es una proteína estructural en la superficie de las gotas lipídicas, que no sólo se expresa durante la adipogénesis como indica su nombre, sino que también se usa como marcador en la formación de las gotas lipídicas en muchos otros sistemas celulares (Straub *et al.*, 2013; Itabe *et al.*, 2017). En cuanto a TIP47, sus funciones celulares no están tan estudiadas, aunque se cree que puede regular la lipólisis en músculo esquelético (Macpherson *et al.*, 2013). Además, por homología de secuencia y funcional, se han descubierto otras proteínas asociadas a esta

familia PAT en las gotas lipídicas como son OXPAT/MLDP/PAT-1 y S3-12 que a día de hoy están mucho menos conocidas (Wolins *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2006). El descubrimiento de esas nuevas proteínas adicionales a las 3 clásicas de la familia PAT ha hecho que se proponga una nueva nomenclatura para esta familia de proteínas, denominando perilipina-1 a perilipina A, perilipina-2 a ADRP, perilipina-3 a TIP47, perilipina-4 a S3-12 y perilipina-5 a OXPAT (Kimmel *et al.*, 2010). En la tabla 1 del Anexo I se muestran las características de todas las proteínas de la familia PAT.

Además de esa familia de las perilipinas, las gotas lipídicas presentan asociadas una gran cantidad de proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico, lo cual da idea de la gran importancia de estos orgánulos en la regulación lipídica global de la célula. Entre ellas destacan la triglicérido lipasa adiposa o ATGL, su co-activador CGI-58 (*Comparative Gene Identification-58*) (Xu *et al.*, 2017), la lipasa sensible a hormonas o HSL (Shen *et al.*, 2009), CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT) (Krahmer *et al.*, 2011), lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) (Moessinger *et al.*, 2011), acil-CoA sintetasa de cadena larga 3 (ACSL3) (Poppelreuther *et al.*, 2012), lipina-1 (Sembongi *et al.*, 2013) o la fosfolipasa A2 citosólica de Grupo IVA (cPLA2 $\alpha$ ) (Yu *et al.*, 1998) entre otras.

### **1.3. Metabolismo de las grasas en el tejido adiposo: lipogénesis *versus* lipólisis.**

#### **1.3.1. Lipogénesis**

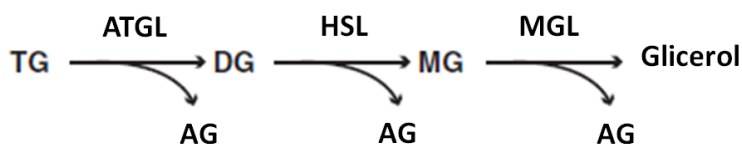
La síntesis de AGs (**lipogénesis**) en los tejidos lipogénicos está sometida a un estricto control nutricional y hormonal. Muchas de las enzimas involucradas en la producción de estas moléculas están reguladas durante los periodos de ayuno e ingesta de alimentos. Las actividades específicas de estas enzimas son muy bajas en situación preprandial, por regla general. Con la ingesta de alimentos (especialmente durante el consumo de dietas ricas en carbohidratos) sus actividades específicas aumentan de forma concomitante a la concentración plasmática de glucosa e insulina. En condiciones normales, este proceso es llevado a cabo principalmente en el hígado y en el tejido adiposo. La lipogénesis comienza con la conversión de citrato a acetil-CoA por acción de la enzima ATP-citrato liasa (ACYL). El resultante acetil-CoA es carboxilado a malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACACA). Para finalizar, el malonil-CoA es



convertido en palmitato gracias a la enzima sintetizadora de AG (FASN). El palmitato, tras una serie de reacciones podrá formar otros ácidos grasos de cadena más larga o con dobles enlaces (insaturaciones) (Ameer *et al.*, 2014).

### 1.3.2. Lipólisis

Los procesos lipolíticos ocurren continuamente en todos los tejidos y tipos celulares. Importantes enzimas y factores reguladores de este sistema han sido identificados y caracterizados a lo largo de los últimos 15 años. La lipólisis consiste en una hidrólisis secuencial de una molécula de TG en tres de AGs y una de glicerol por medio de enzimas hidrolíticas comúnmente llamadas lipasas. En mamíferos, destacan tres lipasas que actúan secuencialmente con la consecuente liberación de un AG en cada etapa (Figura 7). ATGL convierte los TGs en diglicéridos (DG) y es considerada una enzima limitante en el proceso lipolítico (Zimmermann *et al.*, 2004). Los DGs son hidrolizados a monoglicéridos (MG) por acción de la enzima HSL (Haemmerle *et al.*, 2002), y por último la enzima lipasa para monoglicéridos (MGL) escinde MG en glicerol y AG (Fredrikson *et al.*, 1986). El principal regulador positivo de la lipólisis en humanos son las catecolaminas cuando se unen a su receptor  $\beta$ -adrenérgico y los péptidos natriuréticos, mientras que por el contrario la insulina y las catecolaminas cuando se unen a su receptor  $\alpha$ -adrenérgico ejercen un efecto antilipolítico (Nielsen *et al.*, 2014).



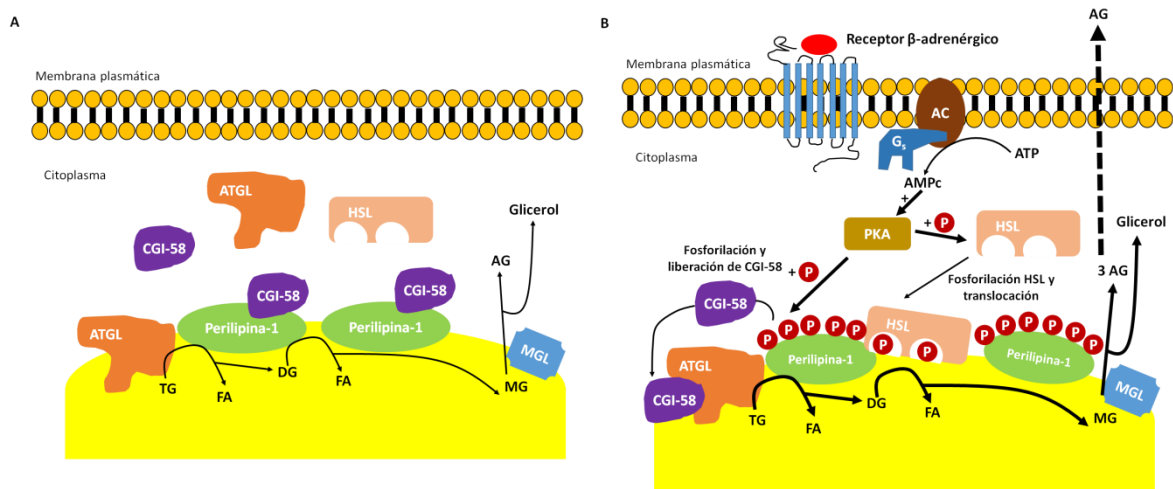
**Figura 7. Esquema de la hidrólisis de triglicéridos.** Los triglicéridos (TG) son hidrolizados completamente por tres lipasas que actúan secuencialmente (ATGL, HSL, MGL), con la liberación de un ácido graso (AG) en cada etapa. ATGL, triglicérido lipasa adiposa; HSL, lipasa sensible a hormonas; MGL, lipasa para monoglicéridos.

La lipólisis requiere que las lipasas, que mayoritariamente se localizan en el citoplasma, tengan acceso a los TGs del interior de la gota lipídica, altamente hidrofóbico. Se sabe que varias proteínas citosólicas y asociadas a las gotas de lípidicas modulan las tasas de lipólisis basal y/o estimulada (Frühbeck *et al.*, 2014). Como anteriormente se ha comentado, las proteínas de la familia PAT, las perilipinas, son

consideradas unos de los principales reguladores del proceso lipolítico en el tejido adiposo y el resto de tejidos (músculo, hígado...). Perilipina-1 tamiza la membrana de la gota lipídica en el TAB convirtiéndose en una barrera protectora para restringir el acceso de las lipasas de TGs (ATGL y HSL) al núcleo de lípidos neutros, facilitando el almacenamiento de TG bajo condiciones basales (Duncan *et al.*, 2007). Se sabe que perilipina-1, en situaciones basales, secuestra al activador de ATGL, CGI-58, manteniendo así esta lipasa inactiva (Kimmel y Sztalryd, 2016) (Figura 8a). En situaciones de necesidad energética, la vía lipolítica es estimulada por medio de la unión de la adrenalina a su receptor  $\beta$ -adrenérgico en la membrana del adipocito (González-Yanes y Sánchez-Margalet, 2006), lo que activa la vía adenilato ciclasa para producir AMP cíclico (AMPC) y así activar la proteína kinasa A (PKA) (Langin, 2006). Perilipina-1 es una de las principales dianas de PKA en el adipocito, existiendo seis sitios de fosforilación repartidos entre el N y el C-terminal (Ser-81, Ser-223, Ser-277, Ser-434, Ser-492, y Ser-517) (Duncan *et al.*, 2007; Frühbeck *et al.*, 2014; Itabe *et al.*, 2017). La fosforilación en la Ser-492 induce a que las gotas lipídicas de mayor tamaño se escindan en múltiples de menor tamaño, con menos perilipina-1, y por tanto, con una mayor superficie accesible para las lipasas (Marcinkiewicz *et al.*, 2006). Por otra parte, la fosforilación en el aminoácido Ser-517 permite que CGI-58 sea liberada, pudiendo así activarse la lipasa ATGL. Además, la fosforilación de CGI-58 mejora su capacidad de reclutar, movilizar y activar ATGL, que cataliza el paso inicial de la lipólisis (Miyoshi *et al.*, 2007; Granneman *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2014). La fosforilación en el N-terminal de perilipina-1 es esencial para que HSL, la cual había sido previamente fosforilada por la PKA, se una a perilipina-1 y lleve a cabo la conversión de DG a MG (Kimmel y Sztalryd, 2016) (Figura 8b).

En ratones knockout (KO) para perilipina-1 se ha observado que la ausencia de esta proteína confiere resistencia a la obesidad tanto genética como inducida por la dieta, produciendo unos ratones con un fenotipo delgado, adipocitos más pequeños, aumento de la lipólisis basal y atenuación de la lipólisis estimulada (Martinez-Botas *et al.*, 2000). Haciendo referencia a lo explicado con anterioridad, los ratones KO-perilipina-1 presentan una tasa elevada de lipólisis basal debido a que CGI-58 no estará secuestrado y ATGL se mantendrá constantemente activa. Por el contrario, en los adipocitos de estos ratones la tasa de lipólisis estimulada se encuentra significativamente reducida en comparación a los ratones *wild type* debido a que HSL

no puede ser reclutada en la superficie de la gota lipídica (Shen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).



**Figura 8. Representación esquemática de la lipólisis basal (A) y estimulada (B) en el tejido adiposo humano.** Las catecolaminas regulan los procesos de lipólisis intracelular aumentando los niveles de AMPc y activando a lipasas que hidrolizan los triglicéridos acumulados en el interior de gotas lipídicas. ATGL, triglicérido lipasa adiposa; CGI-58, *Comparative Gene Identification-58*; HSL, lipasa sensible a hormonas; AC, adenilato ciclasa; MGL, monoglicérido lipasa; PKA, proteína quinasa A; TG, triglicérido; DG, diglicérido; MG, monoglicérido; AG, ácido graso.

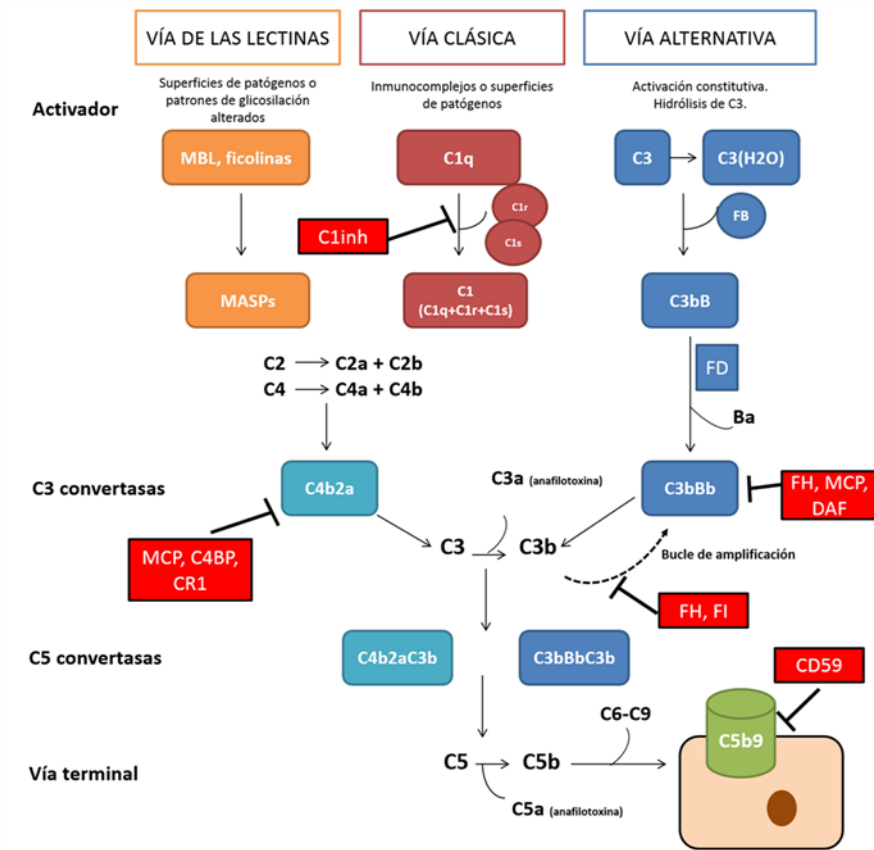
## 1.4. El papel del sistema del complemento en el tejido adiposo.

### 1.4.1. El sistema del complemento

El sistema del complemento es un componente fundamental de la inmunidad innata, donde juega un papel crucial en la defensa contra infecciones, la eliminación de células apoptóticas, el procesamiento de inmunocomplejos y la modulación de la inmunidad adaptativa. La activación del complemento tiene lugar a través de tres vías de activación distintas: **la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas** (Figura 9). Estas tres vías, estrechamente relacionadas filogenéticamente, se diferencian en sus mecanismos de activación y en las etapas iniciales, pero todas ellas confluyen en la formación de complejos enzimáticos multimoleculares responsables de la activación del componente C3, denominados convertasas de C3 (Ricklin *et al.*, 2010).

La vía clásica se activa principalmente por la unión de C1q a complejos antígeno-anticuerpo y la activación de la vía de las lectinas ocurre fundamentalmente

por el reconocimiento de grupos manosa característicos de superficies bacterianas. La activación de estas 2 vías da lugar a la generación de un complejo proteico con actividad enzimática: la convertasa de C3 de la vía clásica/de las lectinas (C4b2b) capaz de activar la molécula de C3, escindiéndola en C3a y C3b.



**Figura 9. El sistema del complemento.** El sistema del complemento puede ser activado por 3 vías. La activación por alguna de ellas lleva a la generación de una convertasa de C3 (C4b2b o C3bBb) que corta C3 en C3a y C3b. El C3b generado por cualquier convertasa puede formar, a su vez, más convertasa de la vía alternativa, a través de la cual se produce la amplificación de la activación del complemento. La unión de una nueva molécula de C3b a las convertasas de C3 les confiere la capacidad de cortar C5 en C5a y C5b. Este último inicia la vía terminal del complemento, que eventualmente lleva a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9), lisando las células diana. La activación del complemento está controlada a varios niveles mediante diversas proteínas reguladoras, tanto solubles como de membrana.

La vía alternativa es constitutivamente activa, debido a la activación espontánea de C3 en plasma a través del mecanismo “tick-over”. La activación de C3 genera los fragmentos C3a y C3b, pudiéndose asociar éste último al factor B (FB) para formar la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bB) en estado inactivo. Cada complejo C3bB pasa a su estado activo por medio del corte proteolítico que ocasiona el factor D (FD)

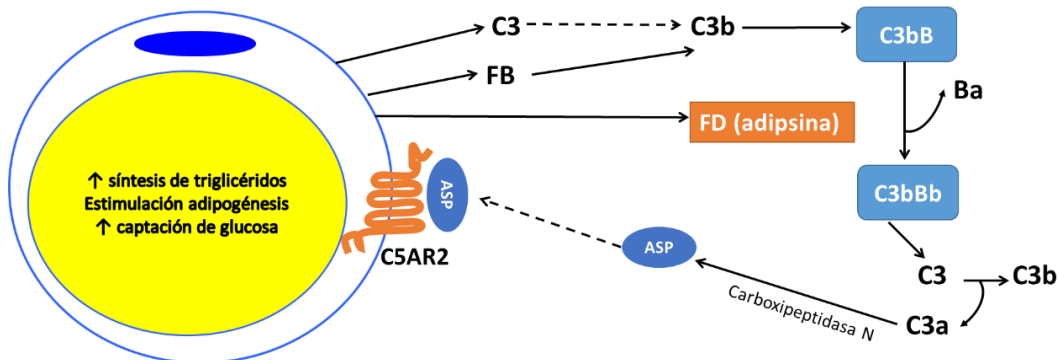
sobre FB, originando así los fragmentos Ba y Bb. El complejo resultante, C3bBb, es capaz de amplificar el sistema por medio de un feedback positivo para generar en muy poco tiempo miles de moléculas de C3b (Ricklin *et al.*, 2010). La convertasa C3bBb que se forma es inestable y requiere estabilizarse por medio del regulador positivo, properdina (P), el cual incrementa la vida media de este complejo multimolecular y sirve como un foco para la amplificación local del complemento (Blatt *et al.*, 2016). Cuando una molécula de C3b se incorpora a una convertasa de C3 se origina la convertasa de C5, capaz de cortar C5 generando C5a, una potente anafilotoxina, y C5b que actúa como iniciador en superficies celulares para conformar junto C6, C7, C8 y C9 el complejo de ataque a la membrana (C5b9).

La rápida y efectiva disociación del complejo C3bBb y la inactivación de C3b es un paso crítico para la homeostasis del complemento y prevenir el daño sobre superficies o tejidos propios cuando se activa. Estas funciones son llevadas a cabo por una serie de proteínas reguladoras solubles factor H (FH) y factor I (FI) y de membrana (MCP, DAF, CR1, CD59) (Figura 4). La importancia de la integridad de este sistema se pone de manifiesto porque las deficiencias de alguno de sus componentes pueden causar patologías importantes que pueden llegar a ser letales. También los problemas surgen por una regulación ineficiente lo que puede ocasionar activación indiscriminada y generación de fragmentos circulantes o lesiones en tejidos (Harris *et al.*, 2012).

### **1.4.2. El sistema del complemento y el metabolismo lipídico.**

A finales de los años 80 y principios de los 90, dos líneas de investigación por separado convergieron en que el sistema del complemento era un importante regulador del metabolismo lipídico en el tejido adiposo. El grupo del doctor Spiegelman demostró que los adipocitos de ratón secretaban una proteína que llamaron **adipsina**, la cual tenía unas funciones relevantes para el desarrollo del tejido adiposo (Min *et al.*, 1986; Cook *et al.*, 1987). Años después, esta proteína resultó ser idéntica a FD humano, del cual ya se conocía que tenía unas funciones clave en la activación de la vía alternativa del complemento (White *et al.*, 1992). Estos autores demostraron que los adipocitos no solo sintetizaban FD, sino que también sintetizaban otros componentes de la vía alternativa, como C3 y FB, y los reguladores properdina, FH y FI (Choy *et al.*, 1992; Choy *et al.*, 1996; Peake *et al.*, 1997; Gauvreau *et al.*, 2012), todos ellos necesarios para la activación del complemento en las inmediaciones del adipocito (Figura 10). Mientras

tanto el laboratorio de la doctora Cianflone estaba estudiando una proteína plasmática llamada **Proteína estimulante de la acilación** (del inglés *Acylation Stimulating Protein*, ASP), la cual tenía una potente capacidad para estimular la síntesis de TGs y la captación de glucosa en el tejido adiposo (Cianflone *et al.*, 1989). Tras la caracterización molecular, ASP resultó ser idéntica a un producto de activación del componente C3 del complemento, **C3adesArg**, generado cuando C3a es “inactivado” por acción de la carboxipeptidasa N (Sniderman *et al.*, 1994). Estudios posteriores de este grupo revelaron que el **receptor 2 del componente C5a del complemento** (C5AR2, o también conocido como C5L2) era el único capaz de unir ASP y que además se encontraba altamente expresado en adipocitos y preadipocitos (Kalant *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2009; Poursharifi *et al.*, 2013). A través de esta unión ASP modula positivamente la síntesis de TGs gracias a que modifica drásticamente la cinética enzimática de DGAT, incrementando al doble su velocidad máxima (Yasruel *et al.*, 1991; Kalant *et al.*, 2003; Maslowska *et al.*, 2006). Además, datos experimentales indican que ASP, al igual que la insulina, estimula el transporte de glucosa al interior del adipocito. Esto lo consigue debido a que se induce la translocación de transportadores específicos de glucosa (GLUT1 y GLUT4) hacia la membrana plasmática (Germinario *et al.*, 1993) (Figura 10B).



**Figura 10. Papel del sistema del complemento en la biología del adipocito.** Los adipocitos secretan componentes del complemento como C3, factor B (FB) y factor D (FD, adipsina) y son capaces de activar la vía alternativa en sus inmediaciones. El C3a producido es inactivado por acción de la carboxipeptidasa N, dando lugar a la aparición de C3adesArg (ASP, *Acylation Stimulating Protein*). ASP es una adipoquina con actividad biológica cuando se une a su receptor, C5AR2, para estimular la síntesis de triglicéridos durante la maduración del tejido adiposo y la captación de glucosa.

Un elevado número de artículos han demostrado la correlación entre ASP y varias alteraciones metabólicas (diabetes, síndrome metabólico, enfermedad

cardiovascular, síndrome nefrótico, y síndrome de ovario poliquístico) en presencia o ausencia de obesidad (Maslowska *et al.*, 1999; Cianflone *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Por el contrario, con la pérdida de peso (en personas obesas) se produce un descenso sustancial de los niveles (Napolitano *et al.*, 1994; Maslowska *et al.*, 1999; Fisette *et al.*, 2013). En estudios animales, los ratones deficientes en ASP (ya sean C3-/-, FB-/- o FD-/-) reducen significativamente la masa de tejido adiposo, como se refleja por la pérdida de peso y la hipoleptinemia (Murray *et al.*, 2000; Cianflone *et al.*, 2003; Paglialunga *et al.*, 2008). Además, estos ratones son resistentes a la obesidad inducida por la dieta y desarrollan resistencia a la insulina, en comparación a los ratones *wild type* (Murray *et al.*, 2000). Estas consecuencias descritas previamente también se han observado en experimentos en los que se ha bloqueado la acción de ASP por medio de la administración de anticuerpos bloqueantes contra ASP o contra su receptor, C5AR2 (Cui *et al.*, 2007; Paglialunga *et al.*, 2010). Como consecuencia de la disfunción del tejido adiposo, el incremento de la lipemia que se produce en estas situaciones se compensa a través del depósito ectópico de grasas en hígado y músculo (Cui *et al.*, 2007; Paglialunga *et al.*, 2008; Paglialunga *et al.*, 2010).

## **1.5. Lipodistrofias**

### **1.5.1. Concepto y clasificación**

**Las lipodistrofias** son un conjunto heterogéneo de patologías ultra-raras caracterizadas por el déficit específico de tejido adiposo en ausencia de privación nutricional o estado catabólico. La pérdida de tejido adiposo puede afectar al cuerpo entero (**generalizadas**), solo a ciertas regiones bien delimitadas (**parcial**), o a pequeñas áreas bajo la piel (**localizadas**) (Garg, 2004). Se han reportado más de 1000 casos en el mundo, con una prevalencia menor de 1:1.000.000, aunque es probable que este dato esté subestimado. Los tipos anteriormente mencionados se pueden agrupar a su vez en base a su etiología como: **lipodistrofias congénitas (familiares)** o **adquiridas** (Lightbourne y Brown, 2017). A diferencia de las lipodistrofias localizadas, algunas de las formas parciales y todas las generalizadas predisponen a los pacientes a desarrollar resistencia a la insulina y a las complicaciones asociadas a este estado como diabetes *mellitus*, hipertrigliceridemia, esteatosis hepática, ovario poliquístico y acantosis *nigricans*. La severidad de estas complicaciones dependerá del subtipo, la extensión de pérdida de grasa, la edad y el sexo (Hussain y Garg, 2016).

Los principales subtipos de lipodistrofias incluyen la **lipodistrofia generalizada congénita (LGC)**, **lipodistrofia parcial familiar (LPF)**, **lipodistrofia generalizada adquirida (LGA)**, y la **lipodistrofia parcial adquirida (LPA)**. Existen otras enfermedades sistémicas que se asocian a lipodistrofia, como los síndromes progeroides y las enfermedades autoinflamatorias (Hussain y Garg, 2016).

La mayoría de los genes donde se han descrito mutaciones codifican para proteínas implicadas en la diferenciación/supervivencia del adipocito, o en el proceso de formación de la gota lipídica. LGC está causada por mutaciones autosómicas recesivas en *AGPAT2*, *BSCL2*, *CAVI*, y *PTRF* (Jéru *et al.*, 2016). Por otra parte, LPF está causada principalmente por mutaciones autosómicas dominantes en *LMNA*, *PPARG* y *PLIN1*; aunque existen dos tipos con mutaciones recesivas en *CIDEA* y *LIPE* (Jéru *et al.*, 2017). En la tabla 2 de los Anexos se hace referencia a todos los subtipos de lipodistrofias congénitas existentes, el gen asociado y su principal función.

### 1.5.2. Lipodistrofias adquiridas:

Existe un grupo de lipodistrofias en las que no se reconoce un patrón mendeliano de herencia ni una base familiar, tampoco se han identificado mutaciones responsables de estos trastornos, son las denominadas lipodistrofias adquiridas. Éstas incluyen el **síndrome de Lawrence** o LGA, el **síndrome de Barraquer-Simons** o LPA, la lipodistrofia asociada al tratamiento del SIDA y otras (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de las lipodistrofias adquiridas** (Adaptada de Garg, 2004)

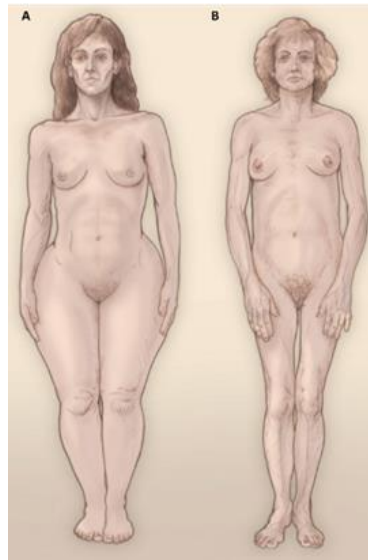
<b>1. Lipodistrofia generalizada adquirida (LGA) o síndrome de Lawrence</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipo 1: variedad paniculitis</li> <li>• Tipo 2: variedad autoinmune</li> <li>• Tipo 3: variedad idiopática</li> </ul>
<b>2. Lipodistrofia parcial adquirida (LPA) o síndrome de Barraquer-Simons</b>
<b>3. Lipodistrofia en pacientes infectados por VIH</b>
<b>4. Lipodistrofias localizadas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipodistrofia localizada inducida por fármacos</li> <li>• Lipodistrofia localizada inducida por presión</li> <li>• Lipodistrofia localizada y paniculitis</li> <li>• Lipodistrofia centrífuga</li> </ul>

#### 1.5.2.1. Lipodistrofia parcial adquirida (síndrome de Barraquer-Simons)

La lipodistrofia parcial adquirida (MIM%613913) fue la primera que se describió hace más de 130 años (Mitchell *et al.*, 1885). Este síndrome se caracteriza por



una pérdida de TAB subcutáneo principalmente en la cara, cuello, brazos, tórax y la parte superior del abdomen, comenzando en la niñez o la adolescencia, aunque se han descrito casos en edades más avanzadas. Los depósitos de grasa de las regiones glútea y extremidades inferiores tienden a preservarse o a aumentar, particularmente en las mujeres (Figura 11A). Las mujeres se ven afectadas hasta 4 veces más que los varones (Misra *et al.*, 2004). En cuanto a la prevalencia de alteraciones metabólicas, existe algo de controversia al respecto, pero lo que está claro es que esta lipodistrofia se asocia con mucha menor frecuencia a estos trastornos en comparación a otras lipodistrofias parciales familiares (43%), y con mucha diferencia a todos los tipos de generalizadas (50-80%) (Misra *et al.*, 2004; Akinci *et al.*, 2015).



**Figura 11. Representación fenotípica de pacientes con lipodistrofia parcial adquirida (A) y con lipodistrofia generalizada adquirida (B) (adaptada de Garg, 2004).**

En este tipo de lipodistrofia un 75-90% de los pacientes presentan niveles muy bajos del componente C3 del sistema del complemento. A su vez, y muy relacionado con lo anterior, más del 80% de los pacientes presentan títulos detectables de C3NeF, un autoanticuerpo que reacciona contra la convertasa C3bBb, incrementando su vida media y provocando la activación masiva de C3 (Hussain y Garg, 2016). Este autoanticuerpo está fuertemente asociado a la aparición de una enfermedad renal conocida como glomerulopatía C3 (GC3). La relación entre la enfermedad renal y la lipodistrofia parcial se describió por Gellis, Green y Walker (Gellis *et al.*, 1958) y posteriormente se asoció con la glomerulonefritis mesangio-capilar por otros autores (Sissons *et al.*, 1976). Dentro del espectro de la GC3, la forma de presentación más

común en la LPA es la enfermedad por depósitos densos (Misra *et al.*, 2004), aunque existe algún caso en el que el estudio histológico desveló una nefropatía IgA (de Lucas-Collantes *et al.*, 2016). El único nexo entre ambas patologías es la hipocomplementemia C3 y la presencia de C3NeF. En este sentido, Mathieson y colaboradores demostraron que C3NeF ocasionaba la destrucción del adipocito debido principalmente a una citotoxicidad dependiente del complemento (Mathieson *et al.*, 1993). También se han descrito asociaciones con enfermedades autoinmunes como el hipotiroidismo, la anemia perniciosa, la dermatomiositis, la artritis reumatoide, la enfermedad celíaca, la arteritis de la temporal, la dermatitis herpetiforme, el lupus eritematoso sistémico (LES) y la vasculitis leucocitoclástica (Misra *et al.*, 2004).

#### ***1.5.2.2. Lipodistrofia generalizada adquirida (síndrome de Lawrence)***

Este trastorno ultra-raro, descrito inicialmente por Ziegler y Lawrence (Ziegler, 1928; Lawrence, 1946), se caracteriza por la pérdida de grasa en todo el cuerpo, incluyendo característicamente la palma de las manos y la planta de los pies (Figura 11B); preservándose la grasa de la médula ósea y la región retroorbital (Misra y Garg, 2003; Garg, 2004). Es una enfermedad que afecta más frecuentemente a mujeres que a hombres (3:1). El debut de la enfermedad suele ocurrir normalmente durante la infancia o la adolescencia; rara vez puede comenzar después de los 30 años (Misra y Garg, 2003). La pérdida de TAB suele ser gradual y lenta, iniciándose en una parte determinada antes de generalizarse a lo largo de meses o años, aunque a veces el proceso apenas dura unas semanas. Estos pacientes están predispuestos a padecer severas complicaciones metabólicas, como resistencia a la insulina o diabetes *mellitus*, acantosis *nigricans*, hipertrigliceridemia grave, esteatosis hepática e hipoleptinemia (Brown *et al.*, 2016). Aproximadamente un cuarto de los pacientes debuta con un episodio de nódulos inflamatorios subcutáneos, denominado paniculitis. Inicialmente estas lesiones se curan, con pérdida localizada de grasa subcutánea, pero posteriormente se pierde grasa de casi todas las regiones subcutáneas, lo que eventualmente causa lipodistrofia generalizada (Misra y Garg, 2003; Garg, 2004). Otro 25% de los pacientes tienen enfermedades autoinmunes asociadas, especialmente dermatomiositis juvenil, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), y síndrome de Sjögren (Misra y Garg, 2003; Hussain y Garg, 2016). En los pacientes restantes, el mecanismo subyacente de pérdida de grasa no está claro (variedad idiopática). Por lo general, las complicaciones metabólicas son menos graves en pacientes con variedad de paniculitis

en comparación con los otros dos subtipos (Misra y Garg, 2003; Garg, 2004; Hussain y Garg, 2016).

La patogénesis de la LGA puede ser variable, y los mecanismos exactos de pérdida de grasa continúan siendo desconocidos. En pacientes con paniculitis y variedades autoinmunes, se sospecha que la pérdida de tejido adiposo tiene un origen inmunológico (Garg, 2004). La única evidencia de autoanticuerpos contra adipocitos se informó en un paciente masculino de 33 años con LGA, diabetes *mellitus* resistente a la insulina y acantosis *nigricans*. Los autores demostraron la presencia de depósitos de IgG alrededor del adipocito mediante inmunofluorescencia directa en una biopsia subcutánea del paciente (Hübler *et al.*, 1998). Además, se ha descrito que algunos pacientes tienen hepatitis crónica con características autoinmunes y bajos niveles de C4 del complemento, lo que sugiere la participación de la vía clásica del complemento en la patogenia de la pérdida de grasa (Savage *et al.*, 2009; Eren *et al.*, 2010). Un trabajo reciente presentó a tres pacientes masculinos diagnosticados de lipodistrofia generalizada, con desarrollo posterior de astrocitoma pilocítico. Todos ganaron grasa corporal o peso después de la extirpación quirúrgica del tumor y/o quimioterapia (Patni *et al.*, 2016). Los autores hipotetizaron que el tumor originó anticuerpos anti-adipocito, que podrían haber inducido la lisis de los adipocitos. Con respecto a esta evidencia, es interesante señalar que los linfomas, en particular el linfoma periférico de células T, se producen en la LGA, con una prevalencia de aproximadamente 7% (Brown *et al.*, 2016). Todos estos datos, así como la asociación clínica o serológica con enfermedades autoinmunes, llevan a concluir que la LGA es una enfermedad autoinmune.

### ***1.5.2.3. Lipodistrofia localizada inducida por fármacos.***

Este tipo de lipodistrofia es una complicación que puede presentarse en la insulinoterapia. El mecanismo responsable probablemente es de naturaleza inmunológica, dada la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-insulina y al depósito local de IgA y C3 (Reeves *et al.*, 1980; Radermecker *et al.*, 2007; Milan *et al.*, 2010). No obstante, no se puede descartar que estén involucrados otros mecanismos, como la presencia de lipasas o el traumatismo repetido. Otros fármacos, como los esteroides y antibióticos, pueden originar una lipodistrofia localizada (Garg, 2004).

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la caracterización de los mecanismos inmunológicos implicados en la patogenia de la lipodistrofia parcial adquirida y la lipodistrofia generalizada adquirida. Para alcanzar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar del perfil de los componentes del sistema del complemento (C3, C4 y C3adesArg) en pacientes con lipodistrofia parcial adquirida y lipodistrofia generalizada adquirida, así como analizar la presencia/ausencia de anticuerpos que desregulan la vía alternativa.
2. Analizar la existencia de anticuerpos dirigidos frente al adipocito o frente al tejido adiposo en pacientes con lipodistrofia parcial adquirida y lipodistrofia generalizada adquirida. Para ello, nos propusimos:
  - 2.1. Detectar y caracterizar los autoanticuerpos en muestras de suero.
  - 2.2. Estudiar el efecto patogénico de los anticuerpos sobre la viabilidad y/o funcionalidad en células del tejido adiposo.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material Biológico**

##### **3.1.1. Poblaciones de estudio.**

La cohorte de pacientes de lipodistrofias adquiridas la componían:

- Ocho pacientes con LPA, todos ellos de nacionalidad española.
- Cinco pacientes con LGA, cuatro de nacionalidad española y uno de nacionalidad portuguesa.

Como población control, se utilizaron 20 donantes sanos. Como controles de enfermedad, se utilizaron 11 pacientes con lipodistrofia localizada causada por inyección intradérmica de insulina (LINS) y 10 pacientes con LES. Todos los pacientes y los controles sanos dieron su consentimiento informado para estos estudios. Adicionalmente, y solamente para el análisis de los niveles circulantes de ASP, se seleccionaron 8 muestras de plasma de pacientes diagnosticados de GC3, todos positivos para C3NeF.

##### **3.1.2. Obtención de muestras de suero.**

De cada paciente o control, se tomaron muestras de sangre-EDTA y sangre en tubo seco (sin anticoagulante) para la extracción de plasma-EDTA y suero, respectivamente. Las muestras de suero y plasma se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser usadas. En todos los casos, se obtuvo el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del hospital y se recogieron los datos clínicos relevantes de cada paciente.

##### **3.1.3. Obtención de muestras de tejido adiposo humano.**

Para llevar a cabo los estudios se utilizaron muestras de TAB subcutáneo humano mediante cirugía abdominal. Estas muestras se obtuvieron siguiendo la normativa recogida en la legislación nacional y europea y aprobada por el Comité Bioético del Hospital Universitario La Paz. Para trabajar con total seguridad, se hicieron estudios serológicos para VIH, hepatitis C y sífilis, requiriendo ser negativos para todos los parámetros. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado del paciente.

Los tejidos se almacenaron en medio Krebs-Ringer Hepes (*Gibco*, Madrid, España) inmediatamente después de su extracción. En caso de emplearlo para estudios

de inmunofluorescencia, el tejido se fragmentó cuidadosamente con material quirúrgico, desechando los vasos sanguíneos más visibles, y se introdujo en Tissue-Tek O.C.T. (VWR, Lutterwork, UK) para congelarse con nitrógeno líquido. Los bloques de tejido se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Los tejidos destinados a la extracción de proteínas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

## **3.2. Técnicas de cultivos celulares.**

### **3.2.1. Dispersión de tejido adiposo y obtención de fracción estroma vascular.**

Con objeto de obtener la fracción estroma vascular, el TAB se sometió a un proceso de dispersión enzimático-mecánico. El tejido adiposo se lavó con PBS estéril para eliminar los restos de sangre y se sometió a disgregación mecánica. Durante el proceso, es importante destacar que los restos de fibrosis y vasos sanguíneos se eliminaron antes de comenzar el aislamiento celular. A continuación, el tejido se introdujo en una solución de colagenasa I (*Sigma-Aldrich*, Madrid, España) al 0,09% (p/v) y se incubó en baño a 37°C con agitación constante durante 45 minutos. A lo largo de la dispersión, los tubos se mezclaron cada 5-10 minutos hasta completar el tiempo de incubación. Una vez acabado el proceso, la reacción se bloqueó con la adición de suero bovino fetal (FBS) (*Gibco*, Madrid, España). Los tubos se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos para obtener la fracción estroma vascular en el pellet y la fracción flotante rica en adipocitos. El pellet con la fracción estroma vascular se resuspende en buffer de lisis (160 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 1 mM EDTA) para eliminar los eritrocitos. Pasados 15 minutos, las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. En el pellet del tubo se encontrará la fracción enriquecida en células mesenquimales, las cuales se pueden congelar hasta su próximo uso o bien sembrar en placas de 10 cm para su expansión y subcultivo.

### **3.2.2. Cultivo y diferenciación adipogénica de células mesenquimales humanas.**

La diferenciación adipogénica de células mesenquimales humanas se realizó en placas de 24 pocillos. Se sembraron unas 30x10<sup>4</sup> células por pocillo en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Gibco*) conteniendo una solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v) y FBS al 10% (v/v). Todos los cultivos celulares se han llevado a cabo en un incubador a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se renovó cada dos días hasta llegar a una confluencia del 100%, siendo ese el



momento de iniciar la diferenciación. El medio de diferenciación, constituido por DMEM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), FBS al 10% (v/v), 1  $\mu$ M de dexametasona (*Sigma-Aldrich*), 1  $\mu$ M de indometacina (*Sigma-Aldrich*), 500  $\mu$ M de IBMX (*Sigma-Aldrich*) y 10  $\mu$ g/ml de insulina (*Lilly*, Madrid, España), se cambió cada dos días, hasta completar tres semanas. Durante la primera semana post-diferenciación comenzaron a observarse pequeñas vesículas lipídicas citoplasmáticas. Todos los experimentos realizados con células mesenquimales incluidos en este trabajo se han llevado a cabo con células que en ningún caso sobrepasaron del décimo pase.

El grado de diferenciación se comprobó mediante la observación de las células teñidas con una solución de Oil Red O (*Sigma-Aldrich*) (Ramirez-Zacarias *et al.*, 1992), que se une específicamente a los triglicéridos neutros acumulados en las células. Para llevar a cabo esta tinción, las células se lavaron durante 1 minuto con isopropanol al 60% (v/v) conservado a -20°C. A continuación, se añadió la solución de Oil Red O al 0,5% (p/v) diluido en isopropanol al 60%, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las células se lavaron de nuevo con isopropanol al 60% durante 1 minuto, y después en repetidas ocasiones con H<sub>2</sub>O destilada hasta retirar el exceso de colorante.

### **3.2.3. Cultivo y diferenciación adipogénica de la línea celular 3T3-L1.**

La línea celular utilizada para realizar este trabajo es la línea celular múrida de preadipocitos 3T3-L1. Se trata de células de tipo fibroblástico obtenidas a partir de embrión de ratón y fueron obtenidas gracias a la generosidad del Dr. David Vicent, del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ). Originalmente, estas células provienen de la línea celular 3T3 (*Swiss albino*) sometidas a un proceso de aislamiento clonal desarrollado por Green y colaboradores (Green y Meuth, 1974), eligiendo aquellos clones capaces de diferenciarse de fibroblastos a adipocitos en presencia de un determinado *cocktail* hormonal.

El cultivo de esta línea celular se realizó siguiendo las pautas indicadas por la ATCC (*American Type Culture Collection*), teniendo siempre en cuenta que las células no alcancen un grado de confluencia superior al 70-80%, ya que, de lo contrario, se reduciría su capacidad de diferenciación a adipocitos. Todos los cultivos celulares se han llevado a cabo en un incubador a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Por último, cabe destacar que todos los experimentos realizados en células 3T3-L1 incluidos

en este trabajo se han llevado a cabo con células que en ningún caso sobrepasaron del 15° pase.

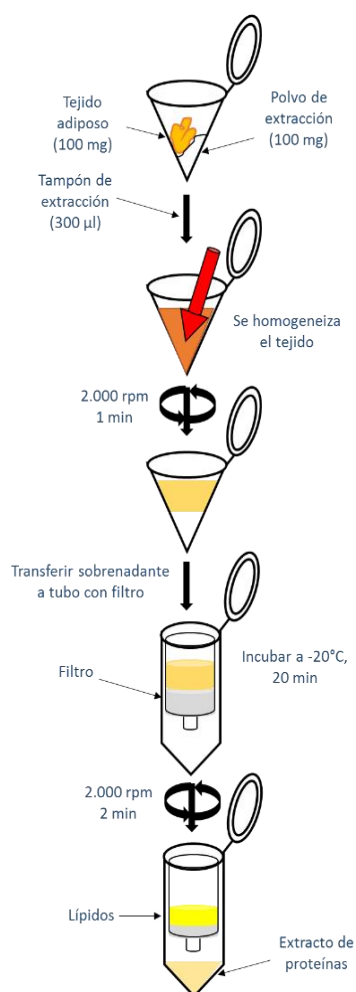
Durante el proceso de expansión, los preadipocitos 3T3-L1 se cultivaron en placas de 10 cm en medio DMEM conteniendo una solución penicilina/estreptomicina al 1% (v/v) y suero de bovino recién nacido (NCS, *Gibco*) al 10% (v/v). El medio se fue cambiando cada dos días hasta llegar a la confluencia deseada. Cuando se llegaba a una confluencia alrededor del 60-70%, fueron refrescados mediante el uso de una solución comercial que contiene tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (*Gibco*). Para estudiar el proceso de adipogénesis, se sembraron en placas de 24 pocillos con  $20 \times 10^4$  células/pocillo. Cuando las células alcanzaron un grado de confluencia moderada, se dejaron en medio de expansión durante 48 horas más, hasta alcanzar una confluencia del 100%, momento en el cual se incubaron con DMEM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), FBS al 10% (v/v), 1  $\mu$ M de dexametasona, 500  $\mu$ M de IBMX y 10  $\mu$ g/ml de insulina durante 48 h. Transcurrido este período, las células se incubaron en DMEM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), FBS 10% (v/v) y 10  $\mu$ g/ml de insulina durante 48 horas, pudiéndose observar en este paso la aparición de algunas gotas lipídicas en el citoplasma de las células. A partir de ese momento, se mantiene el cultivo celular con DMEM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), FBS al 10% (v/v), el cual se mantuvo, renovándose cada 48 h, hasta que las células fueron utilizadas para las distintas manipulaciones experimentales. Adicionalmente, para los experimentos de inmunofluorescencia, las células se cultivaron y diferenciaron en las mismas condiciones sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro tratados con una solución de gelatina al 1% (p/v), los cuales fueron colocados en placas de 24 pocillos. Para comprobar el grado de diferenciación las células se tiñeron con Oil Red O.

### **3.3. Estudios en Western Blot**

#### **3.3.1 Obtención de extractos proteicos.**

La extracción de proteínas totales de TAB subcutáneo se realizó empleando un kit específico para ello, siguiendo las indicaciones de la empresa (*101bio*, Mountain View, CA, USA). Para cada extracción se utilizó aproximadamente 100 mg de tejido, obteniendo cantidades de proteína entre 1-3 mg/ml. La particularidad de este kit es que cuenta con un sistema de membranas que separa prácticamente en su totalidad la fracción lipídica de la proteica, retirando así todas las interferencias producidas por los

lípidos (Figura 12). Debido a que los extractos tenían en mayor o menor medida contaminación con IgG y albúmina, se deplecionaron de ambas proteínas utilizando un sistema de columnas indicado para ello (*ProteoPrep® Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit* de *Sigma-Aldrich*). El contenido proteico se cuantificó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976). Los sobrenadantes se conservaron a  $-80^{\circ}$  hasta su uso.



**Figura 12. Esquema de la extracción de proteínas a partir de tejido adiposo utilizando un kit específico para este tejido.**

### **3.3.2. Electroforesis y electrotransferencia.**

Para la detección de las proteínas de interés mediante la técnica de western blot, el siguiente paso fue preparar las muestras para su separación electroforética. Para ello, se mezcló el extracto con el tampón de carga 4x [Tris-HCl 250 mM, SDS 8 % (m/v), glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), pH 6,8], cargando una cantidad final de 10 µg de extracto por pocillo. El ensayo se hizo en condiciones no reductoras y en condiciones reductoras, y en este último caso, el buffer de carga llevaba además  $\beta$ -

mercaptoetanol 5% (v/v). A continuación, las muestras se hirvieron durante 5 min a 96 °C para desnaturalizar las proteínas y, finalmente, se centrifugaron a 8000 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar restos insolubles. Una vez preparado el extracto proteico, éste se sometió a electroforesis desnaturalizante en geles SDS-PAGE en gradiente 4-20% de poliacrilamida (*Bio-Rad*, Barcelona, España), utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (*Bio-Rad*). La migración se llevó a cabo en un voltaje constante de 200 V hasta que el frente de migración llegó al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF usando el sistema de transferencia *iBlot® Dry Blotting System* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA).

### **3.3.3. Inmunodetección.**

Las membranas fueron bloqueadas con tampón de bloqueo [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, FBS al 5% (v/v), NaCl 150 mM y Tween-20 al 1% (v/v)] durante 1 hora a temperatura en agitación. A continuación, se incubaron con el suero de pacientes y controles diluido en el tampón de bloqueo hasta una dilución 1:100 durante toda la noche a 4°C en agitación. Del mismo modo, cuando lo que se pretendía detectar era perilipina-1, las membranas se incubaron con un anticuerpo comercial anti-perilipina humana desarrollado en oveja diluido 1:250 (*R&D Systems*, Abingdon, UK). Al día siguiente, las membranas se sometieron a tres lavados de 10 minutos cada uno con un buffer TBS-T [Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, y Tween-20 al 0,1% (v/v)]. Para detectar la IgG unida del suero de pacientes y controles, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal dirigido frente a IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina y desarrollado en cabra (diluido 1:8000, de *Jackson Immunoresearch*, Suffolk, UK), mientras que para detectar perilipina, el anticuerpo empleado fue un monoclonal dirigido frente a la IgG de oveja marcado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000 (*Sigma-Aldrich*). En ambos casos, los anticuerpos se diluyeron en tampón de bloqueo y el tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con tampón TBS-T durante 10 minutos. El revelado de la fosfatasa alcalina se realizó con una solución NBT/BCIP (*VWR*), y para parar la reacción se empleó agua destilada. Para conservar las membranas, se secaron entre papeles de filtro durante 24 horas.

Con el fin de caracterizar la especificidad de las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) de los autoanticuerpos en estos pacientes, se desarrolló un inmunoblot en

las mismas condiciones descritas antes, pero empleando un anticuerpo específico para cada subclase. Todas las características técnicas de estos anticuerpos se detallan en la tabla X.

### **3.3.4. Bloqueo peptídico**

Para probar la especificidad de los autoanticuerpos frente a perilipina-1, se confeccionó un ensayo de bloqueo peptídico empleando perilipina-1 recombinante (transcript variant 1, RefSeq: NP\_002657, de *Origene*, Rockville, MD, USA). El suero de una paciente con anticuerpos contra perilipina-1 se diluyó en tampón de bloqueo de Western blot y se incubó durante toda la noche a 4°C con 15 µg de proteína recombinante. En paralelo, se incubó el suero en las mismas condiciones, pero sin proteína. Al día siguiente se procedió del mismo modo a como se ha descrito con anterioridad la metodología de la inmunodetección.

### **3.3.5. Listado de los anticuerpos utilizados en las técnicas de Western blot.**

La lista con todos los anticuerpos empleados para los ensayos de Western blot se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados para las técnicas de western blot.**

<b>Origen</b>	<b>Dirigido contra</b>	<b>Conjugado con</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proporcionado por</b>	<b>Código</b>
Cabra	IgG humana	Fosfatasa alcalina	1:8.000	<i>Jackson Immunoresearch</i>	109-055-008
Oveja	Perilipina-1 humana	-	1:250	<i>R&amp;D Systems</i>	#AF6615
Ratón	IgG de oveja	Fosfatasa alcalina	1:5.000	<i>Sigma-Aldrich</i>	A8062
Ratón	IgG1 humana	Peroxidasa	1:24.000	<i>Southern Biotech</i>	9054-05
Ratón	IgG2 humana	Peroxidasa	1:24.000	<i>Southern Biotech</i>	9060-05
Ratón	IgG3 humana	Peroxidasa	1:30.000	<i>Southern Biotech</i>	9210-05
Ratón	IgG4 humana	Peroxidasa	1:30.000	<i>Sanquin</i>	M1271

### **3.4. Estudios de localización mediante inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.**

#### **3.4.1. Inmunofluorescencia de cortes de tejido adiposo.**

El TAB subcutáneo incluido en OCT se dejó a -20°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el tejido se cortó en un criostato de la marca *Leica* (Heidelberg, Alemania) en rodajas de 10 µm que se depositaron en portas. Pasados 20 minutos, los portas se introdujeron en acetona fría y se fijan a -20°C durante 10 minutos. Los portas ya fijados se guardaron a -80°C hasta su próximo uso. Antes de comenzar la inmunofluorescencia los portas se lavan por inmersión con PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v) en tres ocasiones durante 5 minutos cada vez. Una vez se secaron los restos de PBS, los cortes se rodearon de material hidrofóbico para poder delimitar el espacio donde añadir el volumen con reactivos. Las láminas de tejido se bloquearon con una solución compuesta por PBS a pH 7,4, albúmina de suero bovino (BSA) al 10% (p/v) y Tween-20 al 0,3% (v/v), durante 1 hora a en cámara húmeda. Después del bloqueo, los portas se lavaron tres veces para eliminar el excedente del tampón. A continuación se añadió el suero de los pacientes/controles diluido 1/10 en tampón de dilución [PBS a pH 7,4, BSA al 1% (p/v) y Tween-20 al 0,3% (v/v)] y se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, tras lavar los portas, se empleó un anticuerpo de conejo dirigido frente a la IgG humana conjugado con FITC (*Dako*, Santa Clara, CA, USA). Tras una hora de incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda, los portas se lavan contundentemente para retirar el exceso de anticuerpo no unido y se montan para su visualización en el microscopio de fluorescencia (*Olympus*, Barcelona, España).

#### **3.4.2. Inmunofluorescencia de adipocitos de ratón y humanos.**

Una vez las células alcanzaron el grado de diferenciación deseado, se lavaron con PBS en tres ocasiones para eliminar los restos de medio de cultivo y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Posteriormente los cristales con células se lavaron con PBS para eliminar el PFA. A continuación, los cristales se cubrieron con tampón de bloqueo [PBS a pH 7,4, BSA al 10% (v/v) y Tritón X-100 al 0,3% (v/v)] y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS tres veces, 5 minutos cada vez. Para comprobar si la IgG del suero de los pacientes se unía a los adipocitos, los sueros se diluyeron 1/200 en un tampón de

dilución constituido por PBS a pH 7,4, BSA al 1% (v/v) y Tritón X-100 al 0,3% (v/v) y se incubaron en contacto con las células durante toda la noche a 4°C. Adicionalmente, cuando lo deseado era colocalizar perilipina-1 junto con IgG de los pacientes, se añadió en este mismo paso un anticuerpo monoclonal anti-perilipina humana (*Cell Signaling*, Leiden, The Netherlands) desarrollado en conejo a una dilución 1:100. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS con PBS tres veces, 5 minutos cada vez. Para detectar la IgG unida se añadió un anticuerpo policlonal de conejo dirigido frente a la IgG humana y marcado con FITC (*Dako*) a una dilución 1:250 en tampón de dilución. Para detectar perilipina-1 se añadió un anticuerpo que reconocía la IgG de conejo conjugado con biotina (1:1.000), para posteriormente ser detectado con avidina marcada con TEXAS RED (1:1.000), ambos de *Vector Laboratories* (Peterborough, UK). Todos los anteriores anticuerpos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, protegiendo las células de la luz. De nuevo, las células se lavaron con PBS y los cristales se montaron en portas empleando como medio de montaje DAPI con Vectashield (*Vector Laboratories*). Las imágenes se tomaron usando un microscopio confocal de la marca *Leica*.

### **3.4.3. Listado de los anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.**

La lista con todos los anticuerpos empleados para los ensayos de inmunofluorescencia se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.**

<b>Origen</b>	<b>Dirigido contra</b>	<b>Conjugado con</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proporcionado por</b>	<b>Código</b>
Conejo	IgG humana	FITC	1:250	<i>Dako</i>	F0315
Conejo	Perilipina-1 humana	-	1:100	<i>Cell Signaling</i>	D418
Cabra	IgG de conejo	Biotina	1:1.000	<i>Vector Laboratories</i>	BA-1000
Avidina	Biotina	TEXAS RED	1:1.000	<i>Vector Laboratories</i>	A-2006

## **3.5. Técnicas de inmunoquímica.**

### **3.5.1. Estudio bioquímico de proteínas del complemento.**

Los niveles circulantes de las proteínas C3 y C4 se cuantificaron a partir de muestras de suero mediante nefelometría (*Siemens*, Marburg, Alemania). Los rangos

que se usaron como referencia para determinar si los niveles eran bajos o dentro de la normalidad fueron 75-135 mg/dl para C3 y 14-60 mg/dl para C4.

Los niveles plasmáticos de C3adesArg se determinaron con un kit de ELISA indicado para ello, siguiendo las normas establecidas por el fabricante (*Quidel*). El intervalo de referencia se estableció calculando el promedio de 20 donantes sanos  $\pm$  2 desviaciones estándar. Así, se consideraron niveles normales los comprendidos entre 18,9-69,4 ng/ml.

### **3.5.2. Detección de anticuerpos frente a componentes de la vía alternativa: C3, factor B, properdina, factor I y factor H.**

En general, para estos ELISAS se pegan a la placa 100 ng/pocillo de la proteína purificada frente a la que se van a buscar autoanticuerpos, bien en  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  0,1M pH 9,3 o en PBS, incubándola toda la noche a 4°C. Tras lavar y saturar, se añaden las muestras diluidas en PBS-BSA 0,1% de 1/50 a 1/200, incubándolas 1h a 37°C, a no ser que se indique otra cosa. Después de lavar la placa, se añade un anticuerpo policlonal frente a la IgG humana marcado con peroxidasa (*Jackson Immunoresearch*) diluido 1/5000 en PBS-T y se revela usando ABTS como sustrato. Para los anti-FB, FI, C3 y properdina, se utiliza como curva una muestra de un paciente a la que se le ha asignado de forma arbitraria un título de 2000 UA/ml.

**-Anticuerpos anti-FB:** se siembran 100 ng/pocillo de FB (*Complement Technology*, Tyler, TX, USA) diluido en PBS y la placa se satura con PBS-BSA 3%.

**-Anticuerpos anti-Properdina:** se usan 100 ng/pocillo de properdina (*Complement Technology*) en PBS, saturando después con PBS-BSA 3%.

**-Anticuerpos anti-FI:** se pegan 100 ng/pocillo de FI (*Complement Technology*) en PBS, saturando la placa con PBS-BSA 0,1%.

**-Anticuerpos anti-C3:** se siembran 100 ng/pocillo de C3 purificado (*Complement Technology*) en PBS y se utiliza PBS-BSA 0,1% para saturar.

**-Anticuerpos anti-FH:** se pegan 200 ng/pocillo de FH (*Complement Technology*) diluido en PBS, y se utiliza PBS-T tanto como para lavar como para bloquear. Las muestras de suero se diluyen en PBS-T-BSA 0,1%. Como referencia se utiliza una muestra titulada en 2000 AU/ml, proporcionada por la Dra. Dragon-Durey (Hôpital Georges Pompidou, Paris).



### **3.5.3. Ensayo de microplacas para la detección de factor nefrítico de C3 (C3NeF).**

En las placas de ELISA (Medisorb, Nunc, VWR) se pegaron un 1 µg/ml C3b diluido en PBS, y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la placa con un buffer exclusivo para ello (Veronal 2,5 mM, pH 7.4, NaCl 71 mM, 0,15% Tween-20, MgCl<sub>2</sub> 1mM) y se añadió el buffer de bloqueo (Veronal 2,5 mM, pH 7.4, NaCl 71 mM, 0,15% Tween-20, 1% BSA, MgCl<sub>2</sub> 1mM). La formación in vitro de la convertasa se llevó a cabo mediante la adición de 50 µl de la mezcla de componentes purificados (*Complement Technology*): FB (1 µg/ml), FD (0,2 µg/ml) y con P (0,5 µg/ml) e inmediatamente seguido de 50 µl de suero (diluido 1:50 en buffer). La actividad estabilizadora de C3NeF se detectó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido a la molécula Bb del FB (*Quidel*, San Diego, CA, E.E.U.U.; diluido 1:500; 1h, 37°C), seguido de un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (1:10.000; 1h, 37°C) de *Jackson ImmunoResearch*. El resultado se revela con o-fenildiamina (OPD) (*Sigma-Aldrich*) y se lee la absorbancia a 492 nm. Se consideraron positivas todas aquellas muestras cuya densidad óptica superó 0,3 unidades.

### **3.5.4. Detección de anticuerpos frente a perilipina-1.**

La búsqueda de anticuerpos dirigidos a perilipina se hizo por medio de un ELISA de elaboración propia. La placa de ELISA Medisop (Nunc, VWR) se recubrió durante toda la noche a 4°C con 100 ng de perilipina-1 recombinante (fabricada por OriGene) diluida en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,3. A la mañana siguiente, la placa se lavó cuatro veces con PBS-T [PBS a pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,1% (v/v)]. Los pocillos se saturaron con tampón de bloqueo/dilución constituido con PBS a pH 7,4, leche desnatada al 3% (p/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v). Para la técnica de *screening*, el suero se diluyó 1:100 en tampón de dilución y se aplicó por duplicado. Por otra parte, cuando se titularon los sueros de pacientes positivos se diseñó una curva para cada muestra, por duplicado, con las siguientes diluciones: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600. Las muestras se incubaron durante 1h a 37°C. Posteriormente, tras lavar cuatro veces con PBS-T, la IgG unida se detectó empleando un anticuerpo policlonal contra IgG humana conjugado con peroxidasa (1:10.000). La reacción se reveló con ABTS y se hizo la lectura a 405 nm.

### **3.5.5. Listado de los anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunoquímica.**

La lista con todos los anticuerpos empleados para los ensayos de inmunoquímica se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4. Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunoquímica.**

<b>Origen</b>	<b>Dirigido contra</b>	<b>Conjugado con</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proporcionado por</b>	<b>Código</b>
Ratón	Fragmento Bb	-	1:500	<i>Quidel</i>	A227
Conejo	IgG de ratón	Peroxidasa	1:10.000	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	115-035-062
Cabra	IgG de humano	Peroxidasa	1:10.000	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	109-035-008

### **3.6. Determinación de la actividad lipolítica celular en células 3T3-L1.**

La lipólisis es un proceso fisiológico por el cual los lípidos se degradan en AGs y glicerol por parte de la célula. En esta técnica se va a emplear un análogo radiactivo de ácido palmítico, uno de los AGs más abundantes. Los adipocitos almacenarán el ácido palmítico radiactivo en el interior de la gota lipídica como consecuencia de la formación de lípidos, de modo que al desencadenarse la lipólisis, el ácido palmítico se liberará al medio de cultivo, donde podrá ser cuantificado.

Cuando las células estuvieron correctamente diferenciadas, el medio de cultivo se cambió por medio fresco compuesto por DMEM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), suero bovino fetal al 10% (v/v) y una solución 0,0005  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de ácido palmítico-[9,10- $^3\text{H}(\text{N})$ ] (v/v) (*PerkinElmer*, Madrid, España). Tras incubar las células durante toda la noche a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  con el isótopo, al día siguiente se lavaron tres veces con PBS. Una vez retirado el excedente de isótopo no captado, se añadió medio de cultivo compuesto por MEM (con 1 g/l de D-glucosa y sin piruvato) (Fisher Scientific), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), BSA libre de AGs al 2% (p/v) (Sigma) y una solución isoprenalina 10  $\mu\text{M}$  (p/v) (Sigma). La isoprenalina es un agonista beta adrenérgico que va a estimular la actividad lipolítica en los adipocitos. De esta manera, se midió la lipólisis estimulada. Para medir la lipólisis basal, la única diferencia fue que al medio anteriormente formulado no se añadió de isoprenalina.

Con el fin de valorar el efecto de los autoanticuerpos sobre la vía lipolítica, se decidió utilizar IgG purificada de pacientes y controles. Para ello, la IgG del suero se purificó mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de Proteína G (*ABT*, Madrid, España). A los medios de cultivo se les añadieron 300  $\mu\text{g}$  de IgG de un paciente

con autoanticuerpos y de un donante sano. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> bajo estas condiciones a tres tiempos: 1 hora, 2 horas y 3 horas. En cada intervalo se recogió el 70% del medio de cultivo y se almacenó en nevera hasta su medida. Adicionalmente, se realizaron otros experimentos con algunas modificaciones. Se analizaron el resto de pacientes incrementando la cantidad de IgG hasta 400 µg por pocillo y midiendo la lipólisis a tiempo final de 3 horas. Como control negativo se empleó la IgG de un donante sano en la misma cantidad antes citada. En estos experimentos se añadió, además, 4 µg del anticuerpo policlonal dirigido contra perilipina-1 (*R&D*), como control positivo.

Cada determinación, tanto basal como estimulada, a todos los intervalos, se ensayó por triplicado. Al medio de cultivo recogido previamente se le añadió 2 ml de líquido de centelleo OPTI-FLUOR® O (PerkinElmer) y se agitó hasta total homogenización. Para realizar la lectura, los viales correctamente cerrados se metieron en el contador de centelleo. Cabe destacar que todos los residuos con restos de isótopo fueron eliminados en contenedores especiales para productos radiactivos, cumpliendo la normativa vigente.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS

A continuación se detallan todas las características físicas, antropométricas y clínicas de los pacientes de ambos grupos de lipodistrofias adquiridas. Todos estos datos fueron recogidos de los informes enviados por los médicos especialistas que revisaron periódicamente a estos pacientes. En lo referente a los datos demográficos (Tabla 5), se seleccionaron el sexo, la edad a la fecha de estudio y la edad en el momento del debut. Estos datos mostraron que ambas lipodistrofias son muchos más frecuentes en mujeres que en hombres, y que mayoritariamente, el debut de la misma tuvo lugar durante la infancia. Solamente dos pacientes debutaron a edades avanzadas, LPA6 y LGA5. En el primer caso, la lipodistrofia, la cual afecta exclusivamente al área facial, se desencadenó tras el tratamiento con ortodoncia estética con brackets metálicos. En el caso de LGA5 la pérdida de tejido adiposo se produjo tras la suspensión del tratamiento con anticonceptivos orales. Estos desencadenantes nunca antes se habían relacionado con ninguna lipodistrofia, lo que hace que, junto con el debut tardío, ambos casos sean considerados atípicos.

**Tabla 5. Datos demográficos del grupo de pacientes con lipodistrofia parcial adquirida (LPA) y con lipodistrofia generalizada adquirida (LGA).**

	Sexo (M/F)	Edad (años)	Edad al debut (años)
<b>LPA1</b>	F	78	ND
<b>LPA2</b>	F	13	2
<b>LPA3</b>	F	15	5
<b>LPA4</b>	F	7	4
<b>LPA5</b>	F	48	9
<b>LPA6</b>	F	42	41
<b>LPA7</b>	F	39	7
<b>LPA8</b>	F	44	ND
<b>LGA1</b>	F	33	5
<b>LGA2</b>	H	10	2
<b>LGA3</b>	F	13	3
<b>LGA4</b>	F	51	5
<b>LGA5</b>	F	33	31

Abreviaturas: M, masculino; F, femenino; ND, dato no disponible.

**Tabla 6. Datos físicos, antropométricos y clínicos del grupo de pacientes con lipodistrofia parcial adquirida (LPA) y con lipodistrofia generalizada adquirida (LGA).**

	Sub-tipo	IMC	% grasa	Acan-tosis	Hiper INS	Hipo LEP	Diabe-tes	Hiper TG	Estea-tosis	Auto inmu-nidad	Nefro-patía
<b>LGA1</b>	AI	17,3	8	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	DM1	No
<b>LGA2</b>	AI	15	ND	No	No	Sí	No	No	No	antiGAD+	No
<b>LGA3</b>	AI	16	11	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	APCA+	No
<b>LGA4</b>	ID	19,2	20,5	No	No	Sí	No	No	No	No	No
<b>LGA5</b>	ID	15,2	10,2	No	No	Sí	No	No	No	No	No
<b>LPA1</b>	-	24,3	ND	No	No	No	Sí	Sí	No	Hepatitis autoinmune, FR	EDD
<b>LPA2</b>	-	ND	ND	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>LPA3</b>	-	18	17,7	No	No	Sí	No	No	No	No	NIgA
<b>LPA4</b>	-	16,3	28	No	RI*	No	No	No	No	No	No
<b>LPA5</b>	-	19,8	20,3	No	No	No	No	Sí	No	Tiroiditis de Hashimoto, vitíligo, ANA+	No
<b>LPA6</b>	-	22,3	ND	No	No	No	No	No	No	No	No
<b>LPA7</b>	-	33,8	26	No	No	No	No	No	Sí	Tiroiditis de Hashimoto	No
<b>LPA8</b>	-	22,7	23	No	No	No	No	No	No	No	No

Abreviaturas: LGA, Lipodistrofia generalizada adquirida; LPA, lipodistrofia parcial adquirida; AI, variante autoinmune; ID, variante idiopática; IMC, Índice de Masa Corporal, HiperINS, hiperinsulinemia; RI, resistencia a la insulina; HipoLEP, hipoleptinemia; DM1, Diabetes *mellitus* tipo 1; antiGAD, Anti Glutamato Decarboxilasa; APCA, Anticuerpos anti-células parietales; ANA, Anticuerpos anti-nucleares; FR, factor reumatoide; EDD, Enfermedad por depósitos densos; NIgA, Nefropatía IgA; ND, No disponible. El rango de normalidad del % de grasa corporal es de  $25,9 \pm 6,3$ . \* El valor del parámetro HOMA-IR fue 3,46 (rango normalidad: 0,00-2,60).

En cuanto a los datos clínicos y bioquímicos (Tabla 6) de ambas cohortes, los resultados más destacados se describen a continuación:

**-LGA:** El subtipo mayoritario de LGA en nuestra cohorte fue el autoinmune (60%), seguido del idiopático (40%). El IMC tiende a situarse en el rango de la delgadez en prácticamente todos los casos, lo que está estrechamente relacionado con el bajo porcentaje de grasa que presentaron. Dos pacientes (LGA1 y LGA3) tuvieron

acantosis *nigricans* e hiperinsulinemia; pero solamente uno de ellos llegó a desarrollar diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1). La hipoleptinemia fue una característica típica de estos pacientes, apareciendo en todos los casos de nuestra cohorte. LGA3 tuvo unos niveles de TGs muy elevados ( $> 700$  mg/dl) y unas transaminasas elevadas (GOT: 77 UI/L [5-32 UI/L]; ALT: 131 UI/L [5-31 UI/L]), lo que refleja la aparición de esteatosis hepática (lo cual se confirmó posteriormente por técnicas de imagen). Exclusivamente los pacientes con la variante autoinmune de LGA presentaron enfermedades autoinmunes, como por ejemplo DM1 en LGA1, o marcadores de las mismas, como antiGAD (que reflejan el inicio de una diabetes autoinmune) o APCA (relacionados con gastritis atrófica). Ningún paciente desarrolló enfermedad renal, siendo la lipidosi renal o la nefropatía diabética las formas típicas de presentación en estos casos.

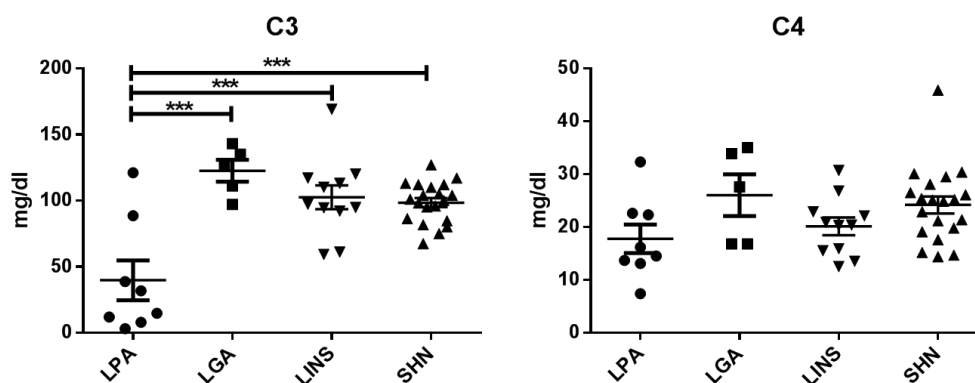
**-LPA:** Las alteraciones en el IMC, así como en el porcentaje de grasa fueron menos frecuentes en nuestra cohorte de pacientes con LPA, en comparación a la cohorte de pacientes con LGA. Estos datos fueron normales debido a que la grasa que se pierde en la parte superior del cuerpo, se acumula en la parte inferior, de modo que esta redistribución hizo que tanto el IMC como el porcentaje de grasa no se vieran alterados en la mayoría de los casos. Las alteraciones metabólicas fueron infrecuentes, en general. Lo único destacable en este sentido fue hipertrigliceridemia moderada en LPA1 y LPA5, y resistencia insulínica en LPA4. Los procesos autoinmunes fueron bastante frecuentes en nuestra cohorte: dos pacientes (LPA5 y LPA7) tuvieron hipotiroidismo autoinmune (Tiroiditis de Hashimoto), otro tuvo vitíligo (LPA5), otro (LPA1) tuvo hepatitis autoinmune como consecuencia de la infección con virus B, y otros presentaron marcadores de autoinmunidad tales como ANAs o factor reumatoide. En cuanto al desarrollo de nefropatía, LPA1 debutó a edad temprana con una enfermedad por depósitos densos y LPA3 debutó con una nefropatía IgA a los 13 años de edad.

## **4.2. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN PACIENTES CON LIPODISTROFIAS ADQUIRIDAS**

### **4.2.1. Estudio del perfil plasmático de componentes del complemento**

Como consecuencia de la importancia del complemento en las lipodistrofias adquiridas, nos propusimos estudiar el perfil plasmático de C3 y C4 en nuestros grupos de pacientes, mediante nefelometría. Todos estos datos vienen recogidos en la figura 13. El rango de normalidad para C3 y C4 es de 75-135 mg/dl y de 14-60 mg/dl,

respectivamente. La media de los niveles de C3 en el grupo de pacientes con LPA fue  $39,7 \pm 42,8$  mg/dl, unos valores significativamente disminuidos ( $p < 0,001$ ) en comparación a los niveles de los pacientes con LGA, con LINS y del grupo de donantes sanos ( $122,6 \pm 18,5$  mg/dl,  $102,5 \pm 29,9$  mg/dl y  $98,5 \pm 15,3$  mg/dl, respectivamente). En cuanto a los niveles circulantes de C4, no se encontraron diferencias entre los tres grupos (LPA:  $17,8 \pm 7,7$  mg/dl; LGA:  $26 \pm 8,9$  mg/dl; LINS:  $20,1 \pm 5,6$  mg/dl; donantes sanos:  $24,2 \pm 7,2$  mg/dl).

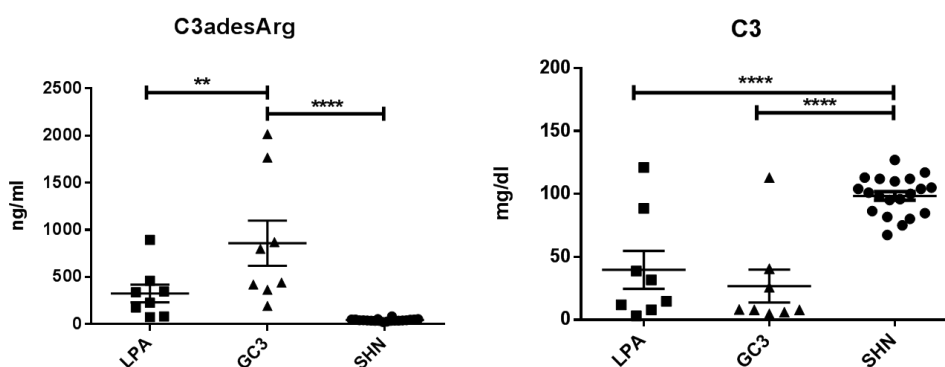


**Figura 13. Niveles plasmáticos de C3 y C4.** Los niveles circulantes de C3 y C4 se midieron mediante nefelometría en muestras de suero de 8 pacientes con lipodistrofia parcial adquirida (LPA), 6 pacientes con lipodistrofia generalizada adquirida (LGA), 11 pacientes con lipoatrofia por inyección intradérmica de insulina (LINS) y 20 donantes sanos (SHN). Existe un descenso significativo de los niveles plasmáticos de C3 en pacientes con LPA, respecto de los otros grupos. El intervalo de referencia para C3 va desde 75-135 mg/dl y de C4 va desde 14-60 mg/dl. Se considera significativo cuando  $p < 0,05$ . \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Debido a la importancia de la adipoquina C3adesArg (ASP) en el metabolismo lipídico decidimos medir los niveles circulantes de la misma en pacientes con LPA. Para compararlos, se midieron los niveles de ASP en pacientes diagnosticados de GC3, positivos para C3NeF, y en donantes sanos (SHN). Los niveles de ASP estuvieron significativamente aumentados en los pacientes con GC3 ( $860,2 \pm 677,2$  ng/ml) con respecto a los pacientes con LPA ( $298,5 \pm 234,6$  ng/ml,  $p < 0,01$ ) y a los donantes sanos ( $44,1 \pm 12,6$  ng/ml,  $p < 0,001$ ) (Figura 14). Aunque la mayoría de los pacientes con LPA tuvieron niveles de ASP por encima del rango superior de referencia, no hubo diferencias significativas con respecto al grupo de donantes sanos. Los niveles de ASP tan bajos en donantes sanos se relacionan con los niveles conservados de C3 en este grupo. Sin embargo, los niveles de C3 se encontraron significativamente bajos en el grupo de pacientes con LPA y con GC3 ( $39,7 \pm 42,8$  mg/dl,  $p < 0,001$ , y  $26,8 \pm 37$  mg/dl,



$p < 0,001$ , respectivamente), con respecto a los controles sanos, lo que explica la elevación sistémica de ASP en estos grupos de pacientes (Figura 14).

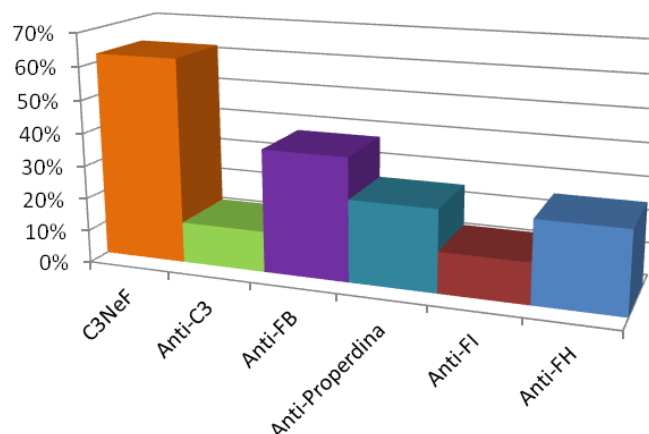


**Figura 14. Niveles plasmáticos de C3adesArg (ASP).** Los niveles circulantes de ASP se midieron mediante una técnica de ELISA en muestras de suero de 8 pacientes con lipodistrofia parcial adquirida (LPA), 8 pacientes con glomerulopatía C3 (GC3), y 20 donantes sanos (SHN). Existe un incremento significativo de los niveles plasmáticos de ASP en pacientes con GC3, respecto de los otros dos grupos. Al lado se presentan los niveles de C3 de todos los grupos, siendo significativamente bajos en los pacientes con LPA y con GC3, en comparación al grupo control. El intervalo de referencia para C3 va desde 75-135 mg/dl y para ASP va desde 18,9-69,4 ng/ml. Se considera significativo cuando  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2. Detección de autoanticuerpos dirigidos frente a componentes de la vía alternativa del complemento

Como se ha comentado anteriormente, las alteraciones del sistema del complemento han sido descritas tanto en la LPA como en la LGA, siendo mayoritarias en el primer caso. Así pues, debido a su importante relación con la patogenia, decidimos completar el estudio del complemento mediante la detección de los autoanticuerpos frente a proteínas de la vía alternativa. El método diagnóstico que se empleó para todos los anticuerpos fue por medio de técnicas de ELISA, descritas en la sección Material y Métodos.

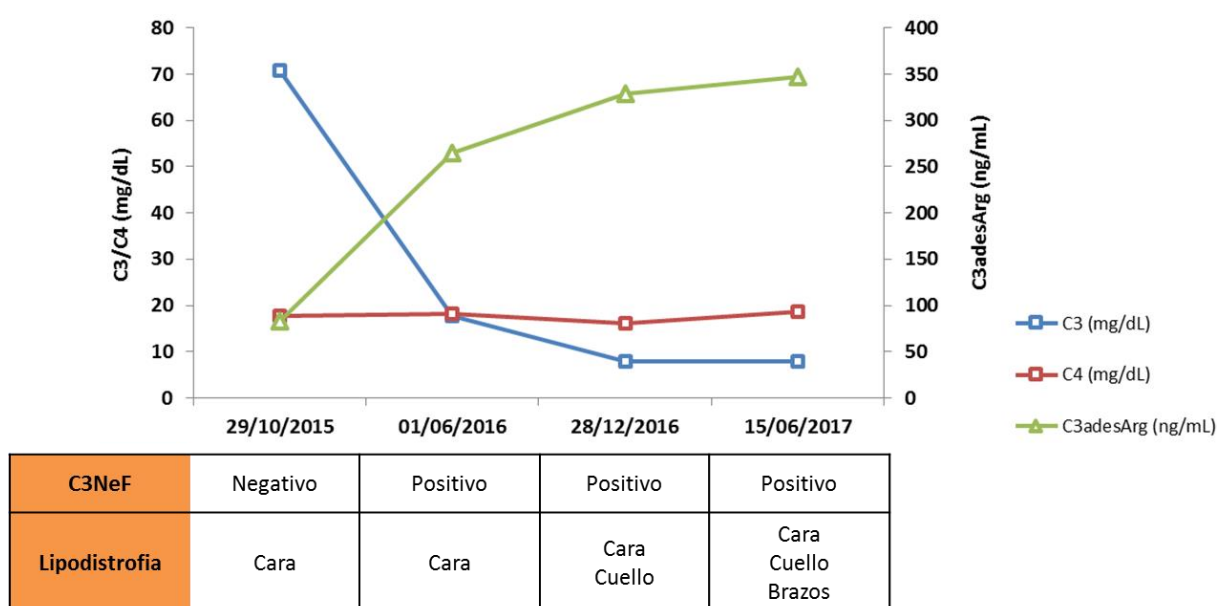
Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los pacientes con LGA tuvo anticuerpos. Sin embargo, el grupo de pacientes con LPA presentaron todo tipo de anticuerpos (Figura 15). El anticuerpo que más se detectó en estos pacientes fue C3NeF (62,5%), seguido en menor proporción por anticuerpos frente a FB (37,5%), y reguladores como properdina (25%) o FH (25%). También se detectaron anticuerpos dirigidos contra C3 o FI; pero con menor frecuencia en comparación a los citados anteriormente.



**Figura 15. Distribución del porcentaje de autoanticuerpos frente a componentes de la vía alternativa del complemento en pacientes con LPA.**

#### 4.2.3. Seguimiento del perfil del sistema del complemento en un paciente con LPA: a propósito de un caso.

Hemos tenido la posibilidad de hacer un seguimiento de los niveles de complemento prácticamente desde el momento del debut en uno de los pacientes (LPA4). Como se muestra en la figura 16, los niveles de C3 ya estaban un poco bajos en la primera muestra y continuaron disminuyendo rápidamente, lo cual coincidió con la detección de C3NeF. Asimismo, los niveles de ASP correlacionaron negativamente con los niveles de C3 ( $r = -0,9894$ ;  $p < 0,0106$ ). En paralelo a estas mediciones se observó un progreso de la pérdida de TAB desde la región facial hasta las extremidades superiores. Los niveles de C4 se mantuvieron dentro de valores normales en todas las mediciones.



**Figura 16. Seguimiento del perfil de complemento y del progreso de la lipodistrofia en un paciente con lipodistrofia parcial adquirida.** Se han medido los niveles circulantes de C3, C4 y C3adesArg (ASP) en un periodo de año y medio. Adicionalmente se analizó la presencia de C3NeF y se notificó el progreso de la lipodistrofia. La presencia de C3NeF se asocia con un acusado consumo de C3 y un incremento en paralelo de ASP. Paralelamente a la desregulación del sistema del complemento se observa un aumento progresivo de las regiones afectadas por la lipodistrofia. El intervalo de referencia para C3 va desde 75-135 mg/dl, para C4 va desde 14-60 mg/dl y para ASP va desde 18,9-69,4 ng/ml.

### 4.3. AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL TEJIDO ADIPOSO

#### 4.3.1. Detección de autoanticuerpos

##### 4.3.1.1. Caracterización inmunológica de los autoanticuerpos dirigidos frente al tejido adiposo.

##### 4.3.1.1.1. Obtención de extractos de tejido adiposo subcutáneo humano.

Se partió de TAB subcutáneo de cuatro donantes femeninas (edades comprendidas entre 22 a 56, con media de 40 años, y un IMC del entre 42,60 a 19,57, con media de 31,3) obtenido mediante abdominoplastia. La extracción se llevó a cabo con un kit diseñado exclusivamente para el tejido adiposo, como se especifica en Materiales y Métodos. La concentración proteica de cada fracción de tejido se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Extractos proteicos de tejido adiposo subcutáneo humano.**

Donante	Peso tejido (g)	Concentración (mg/ml)
I	0,93	1,83
II	0,86	1,76
III	1,10	2,59
IV	1,00	2,10

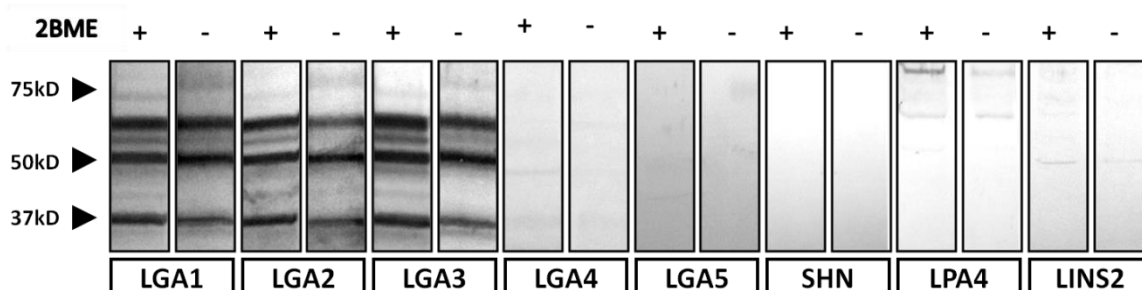
##### 4.3.1.1.2. Antigenicidad del extracto de tejido adiposo humano.

El potencial antigénico así como las condiciones idóneas del ensayo se determinaron realizando un inmunoblot del extracto proteico del TAB humano.

Como se especifica en materiales y métodos, 10 µg de extracto proteico fue sometido a electroforesis en geles SDS-PAGE en gradiente del 4-20% (Bio-Rad). Todos los extractos se deplecionaron de albúmina e IgG con unas columnas indicadas para tal

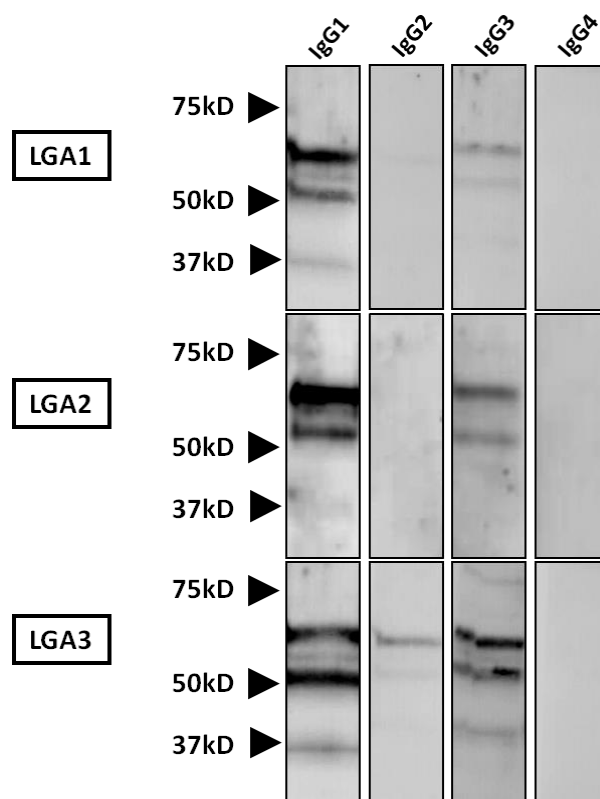
fin, pues su presencia deformaba los carriles y ocasionaba grandes fondos en las membranas a la hora de revelarlas.

Las proteínas desarrolladas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF usando el sistema de transferencia *iBlot® Dry Blotting System* de *Invitrogen*. Tras su posterior bloqueo, se ensayaron los sueros de los pacientes con LPA y LGA, así como de donantes sanos y de pacientes con lipoatrofia adquirida por inyecciones de insulina intradérmica (LINS), como control de enfermedad. Ninguno de los sueros de pacientes con LPA, LINS y donantes sanos resultaron tener alguna especificidad destacable. En cambio, tres de los seis pacientes con LGA (LGA1, LGA2 y LGA3) reaccionaron frente al extracto, reconociendo tres proteínas de un peso molecular comprendido entre 75-37 kDa. El patrón de las bandas fue exactamente el mismo en condiciones desnaturalizantes como no desnaturalizantes. En la figura 17 se muestra en detalle el resultado del inmunoblot para los seis pacientes con LGA, así como el resultado obtenido con un donante sano, un paciente con LPA y otro con LINS. El resto de pacientes negativos (LGA4, LGA5 y LGA6), se testaron de nuevo bajo las mismas condiciones con una dilución del suero 1/50, manteniéndose negativos (dato no mostrado).



**Figura 17. Reactividades de los autoanticuerpos por western blot sobre el extracto de tejido adiposo subcutáneo humano.** En la imagen se detalla el resultado del inmunoblot del suero de cinco pacientes con lipodistrofia generalizada adquirida (LGA), un donante sano (SHN), un paciente con lipodistrofia parcial adquirida (LPA), y un paciente con lipoatrofia adquirida por inyecciones de insulina intradérmica (LINS). 2BME hace referencia al tratamiento con (+) o sin (-) 2-mercaptoetanol.

Con el fin de conocer la especificidad de las subclases de IgG con reactividad frente al TAB, se ensayó un western blot en las mismas condiciones pero empleando un anticuerpo secundario para cada subclase (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). La subclase de IgG predominante en todos los casos fue IgG1, aunque otras especificidades (sobre todo IgG3) aparecieron en menor medida (figura 18).

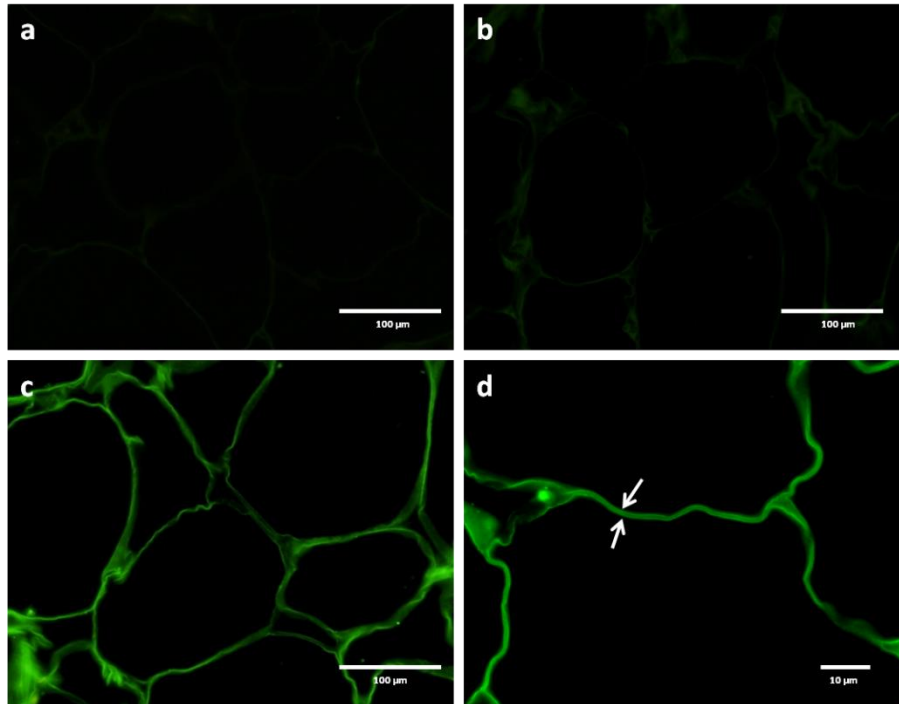


**Figura 18. Especificidad de las subclases de IgG con reactividad frente al tejido adiposo.** El suero de tres pacientes con reactividad frente a extractos de tejido adiposo (LGA1, LGA2 y LGA3) se testó para identificar la subclase de IgG predominante, resultando ser IgG1, y en menor medida IgG3.

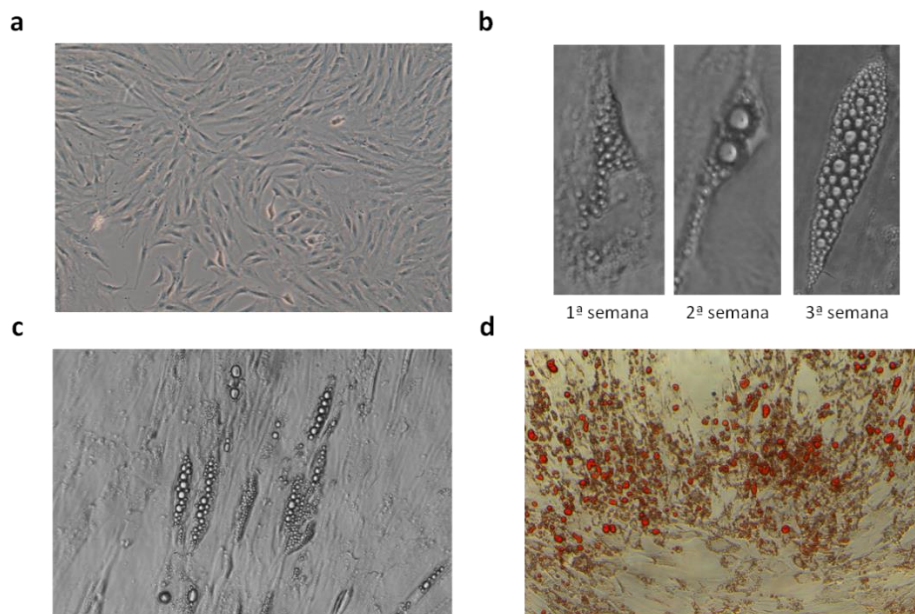
#### *4.3.1.1.3. Estrategia para el estudio de la localización del antígeno.*

La localización del antígeno se observó por IFI sobre criocortes de TAB subcutáneo humano y sobre preadipocitos en cultivo diferenciados a partir de hMSC, como se especifica en materiales y métodos.

Los criocortes de TAB subcutáneo se incubaron con los mismos sueros empleados con anterioridad en el Western Blot. Tras el ensayo no se detectó reactividad de IgG de ninguno de los sueros de donantes sanos ni de pacientes con LPA (figura 19a y 19b, respectivamente). Por otra parte, la tinción que generó el suero del paciente con LGA (previamente positivo por Western Blot) mostró un patrón de fluorescencia claramente distinguible alrededor del adipocito (figura 19d). Los adipocitos del TAB son células que contiene una única gota lipídica que ocupa en torno al 90% del volumen celular, dejando muy poco espacio al citoplasma. Dada esta circunstancia, y aunque se utilizó el objetivo de inmersión, fue complicado determinar si la IgG se había unido a la membrana plasmática o a la membrana de la gota lipídica (figura 19c).



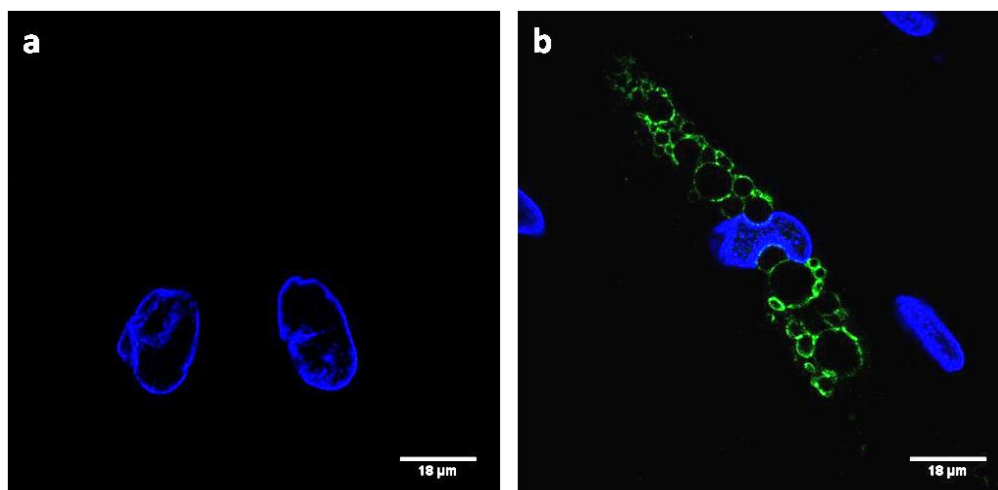
**Figura 19. Patrón de fluorescencia en tejido adiposo.** Los criocortes de tejido adiposo se incubaron con el suero de un donante sano (a), de un paciente con LPA (b) y de un paciente con LGA (c) a una dilución 1/10. La IgG unida se detectó con un anticuerpo marcado con FITC. En la imagen d, tomada con el objetivo de inmersión, se muestra con un mayor detalle del patrón de fluorescencia obtenido con el suero del paciente con LGA.



**Figura 20. Diferenciación de células mesenquimales humanas (hMSC) a adipocitos.** En la imagen (a) se puede observar el aspecto fusiforme de las hMSC en cultivo antes de comenzar la diferenciación. En la imagen (b), por el contrario, se detalla cómo las células van adquiriendo lípidos a lo largo de las tres semanas del proceso adipogénico. La imagen (c) refleja un estado general de las células a las tres semanas de la diferenciación, lo mismo que en la imagen (d), donde se ha llevado a cabo una tinción específica de ácidos grasos con Oil Red O.

La diferenciación de hMCS a adipocitos es un proceso complejo. Se estableció un tiempo máximo de diferenciación de tres semanas, en las cuales las células mesenquimales, con aspecto fusiforme (figura 20a) van almacenando lípidos en forma de gotas lipídicas de tamaño variable (figura 20b). La eficiencia del proceso de diferenciación se situó en torno al 30-50% (figura 20c y 20d).

Una vez obtenidos los adipocitos en cultivo, se fijaron, permeabilizaron, y se incubaron con el suero de un paciente con LGA (previamente positivo) y de un donante sano. Posteriormente, la IgG con reactividad se detectó utilizando un anticuerpo marcado con FITC. Como se puede ver en la figura 21, el paciente con LGA mostró un marcaje claramente localizado alrededor de las gotas lipídicas.



**Figura 21. Inmunofluorescencia indirecta en adipocitos en cultivo.** Los adipocitos en cultivo se incubaron con el suero de un donante sano (a) y de un paciente con LGA (b) a una dilución 1/100. La reactividad de la IgG se detectó con un anticuerpo marcado en FITC. El paciente mostró un patrón de fluorescencia que marca la membrana de la gota lipídica. En azul se muestra en núcleo teñido con DAPI.

#### **4.3.1.1.4. Identificación del antígeno.**

##### **4.3.1.1.4.1. Selección de los candidatos más adecuados.**

Una vez demostrada la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente al tejido adiposo, consideramos que para continuar con el estudio era imprescindible conocer la identidad del antígeno. Para llevar a cabo esto se hizo una aproximación in-silico basada en la búsqueda bibliográfica (Frühbeck *et al.*, 2014; Kimmel y Sztalryd, 2016; Xu *et al.*, 2017) y en bases de datos de acceso libre (<http://www.proteinatlas.org/>; Uhlén *et al.*, 2015). Se seleccionaron 15 genes que dan lugar a proteínas con una elevada expresión

## Resultados

(representada a partir del ARN específico de tejido) y presencia en el tejido adiposo. Las proteínas y los datos seleccionados sobre cada una de ellas se detallan en la tabla 8.

**Tabla 8. Listado de proteínas más enriquecidas en el tejido adiposo humano.**

Gen	Descripción	ARN específico de tejido (TPM)	Peso molecular (kDa)	Localización subcelular	Patología (Número MIM)
<b>FABP4</b>	Proteína de unión a ácidos grasos tipo 4	3642,8	14,7	Citoplasma/Núcleo	-
<b>PLIN1</b>	Perilipina 1	1011,2	56	Gota lipídica	Lipodistrofia familiar parcial tipo 4 (#613877)
<b>ADIPOQ</b>	Adiponectina	935,8	26,4	Secretada	Deficiencia de adiponectina (#612556)
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas	868,9	116,6	Citoplasma	Lipodistrofia familiar parcial tipo 6 (#615980)
<b>PLIN4</b>	Perilipina 4	810,9	136	Gota lipídica	-
<b>CIDEC</b>	<i>Cell death-inducing DFA-like effector c</i>	760,1	26,8	Gota lipídica	Lipodistrofia familiar parcial tipo 5 (#615238)
<b>PNPLA2</b>	<i>Patatin like-phospholipase domain containing 2</i>	419,8	55,3	Gota lipídica	Enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros con miopatía (#610717)
<b>CFD</b>	Factor D (adipsina)	378,7	27	Secretada al medio extracelular	Deficiencia de factor D (#613912)
<b>LEP</b>	Leptina	321,7	18,6	Secretada al medio extracelular	Obesidad mórbida por deficiencia de leptina (#614962)
<b>CIDEA</b>	<i>Cell death-inducing DFA-like effector a</i>	220,9	24,7	Gota lipídica	-
<b>ACACB</b>	Acetil-CoA carboxilasa beta	194	276,5	Mitocondria	-



<b>GYG2</b>	Glicogenina 2	161,7	55,2	Citoplasma/Núcleo	
<b>TUSC5</b>	Supresor de tumores candidato 5	109,9	19,3	Membrana plasmática	-
<b>LGALS12</b>	Lectin, galactoside-binding, soluble 12	89,7	37,5	Mitocondria/Núcleo	-
<b>ACVR1C</b>	Receptor de Activina A, tipo 1C	33,9	54,9	Membrana plasmática	-

Abreviaturas: TPM, Transcritos Por Millón; kDa, kilodaltons; OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*.

La mayor parte de estas proteínas participan de manera relevante en vías metabólicas. El criterio que se siguió para seleccionar al candidato más probable fue el siguiente (en orden de importancia):

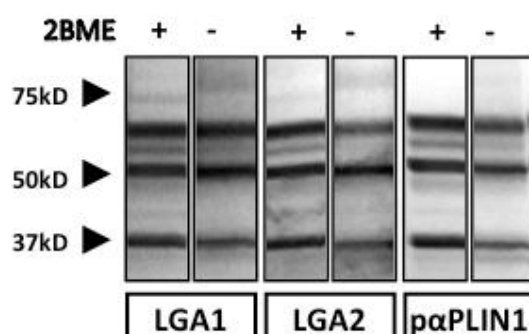
- 1) Que al menos una de las tres bandas que aparecen en el Western Blot coincida con el peso molecular de alguna de las proteínas.
- 2) Que la proteína se localice en las gotas lipídicas.
- 3) Que se hayan documentado mutaciones en la proteína se relacionen con alguna lipodistrofia.

Siguiendo esos criterios, según el peso molecular se seleccionaron cuatro candidatos: *PLIN1*, *PNPLA2*, *GYG2* y *ACVR1C*. De ellas, *PLIN1* y *PNPLA2* se localizaban la membrana de la gota lipídica. Por último, *PLIN1* era el único gen en el cual se habían descrito mutaciones que se relacionaban con la lipodistrofia familiar parcial de tipo 4 (Gandotra *et al.*, 2011a; Gandotra *et al.*, 2011b; Kozusko *et al.*, 2015). El gen *PLIN1* codifica para perilipina-1, una de las proteínas mayoritarias de la gota lipídica en el TAB subcutáneo de humanos (Kimmel y Sztalryd, 2016).

Desde este momento, perilipina-1 se seleccionó como el candidato más probable y se procedió a analizar si la especificidad de los autoanticuerpos presentes en pacientes con LGA estaba realmente dirigida contra esta proteína.

**4.3.1.1.4.2. Identificación de la proteína perilipina-1 en extractos de tejido adiposo.**

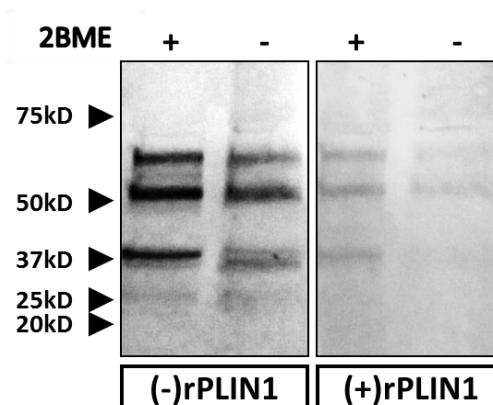
Una vez seleccionada la proteína perilipina-1 como el antígeno más probable, lo primero que se hizo fue identificar esta proteína en los extractos de tejido adiposo mediante western blot, tal y como se especifica en materiales y métodos. Para ello se empleó un anticuerpo policlonal desarrollado en oveja (*R&D*) a una concentración de 1 µg/ml. En paralelo se realizó un inmunoblot ensayando el suero de algunos pacientes positivos. Así pues, el patrón de bandas detectado con el suero de los pacientes fue totalmente coincidente con el que detectado con el anticuerpo policlonal específico para perilipina-1 (figura 22).



**Figura 22. Western blot para la detección de perilipina-1 en extractos de tejido adiposo humano.** Se analizó la presencia de perilipina-1 en extractos de tejido adiposo empleando un anticuerpo policlonal específico (pαPLIN1). Simultáneamente se probaron dos sueros de pacientes positivos (LGA1 y LGA2). El patrón de bandas detectado con el anticuerpo policlonal es totalmente coincidente con el detectado con los sueros de los pacientes. 2BME hace referencia al tratamiento con (+) o sin (-) 2-mercaptoetanol.

**4.3.1.1.4.3. Estudios de especificidad de los autoanticuerpos.**

Con el fin de demostrar si la especificidad de los autoanticuerpos era exclusiva contra la perilipina-1, el suero de un paciente positivo (LGA2) se incubó con una elevada cantidad de perilipina-1 recombinante (*Origene*). Lo que se perseguía con esto era que la proteína se acomplejara con la IgG del suero, de modo que al ensayar la reactividad de ese suero frente al extracto mediante inmunoblot, la señal desapareciera. Tras desarrollar el ensayo tal y como se indica en la sección Material y Métodos, se produjo una reducción muy significativa de la señal, en comparación al resultado obtenido con el mismo suero sin bloquear (figura 23).



**Figura 23. Análisis de la especificidad de los autoanticuerpos en pacientes con LGA.** El suero del paciente LGA2 se incubó toda la noche con 14  $\mu$ g de perilipina-1 recombinante (rPLIN1). Paralelamente el mismo suero se incubó en las mismas condiciones pero con volumen igual de PBS sin proteína. Como se puede observar, la reactividad del suero bloqueado (+) disminuye drásticamente respecto del suero sin bloquear (-). 2BME hace referencia al tratamiento con (+) o sin (-) 2-mercaptoetanol.

Con este resultado se concluyó que a pesar de la elevada homología existente entre varias de las proteínas de la familia de las perilipinas, la especificidad de los autoanticuerpos encontrados en los pacientes con LGA era en su totalidad frente a perilipina-1.

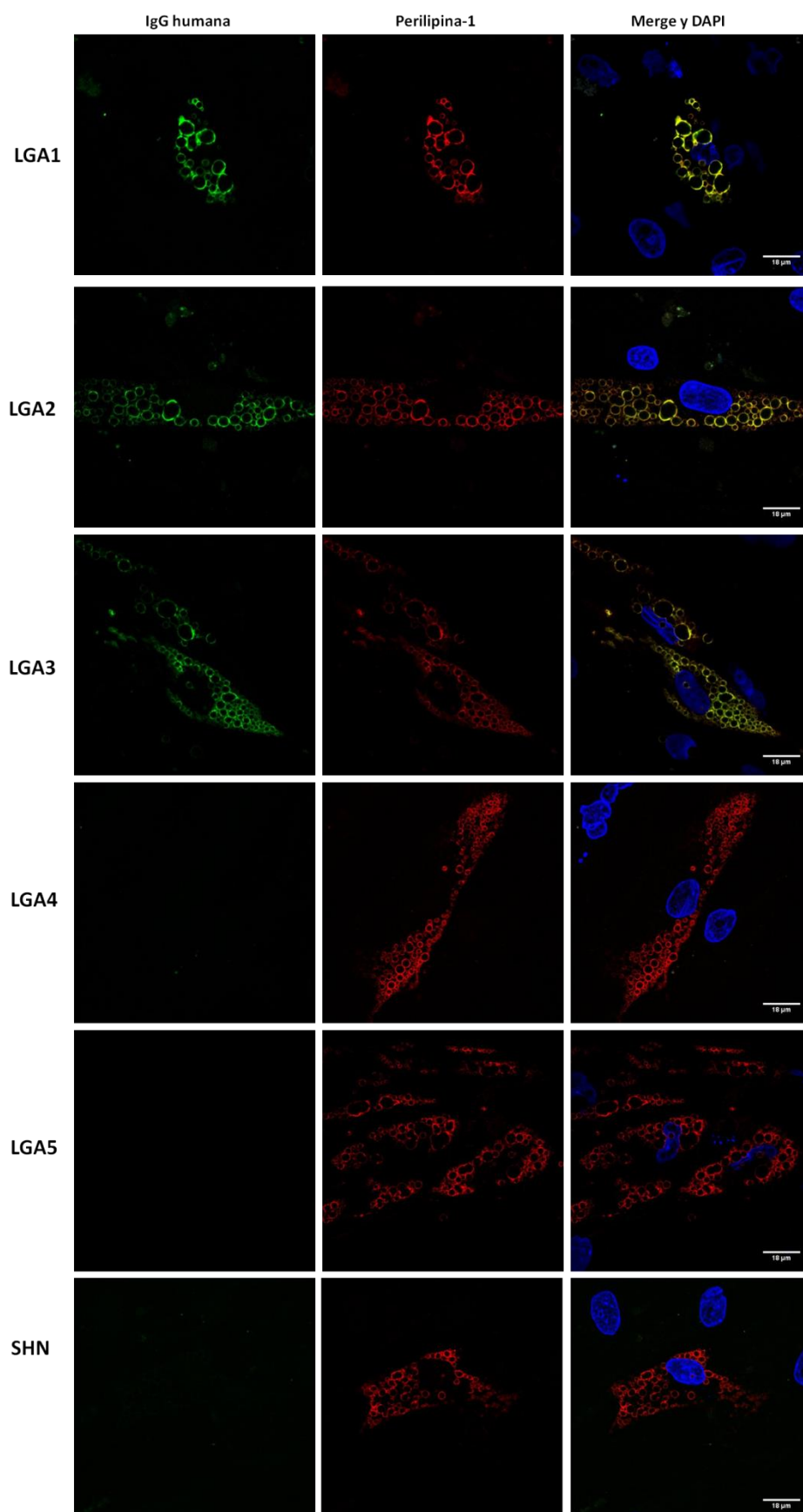
#### ***4.3.1.1.4.4. Colocalización de la IgG humana anti-perilipina-1 y de perilipina-1 en adipocitos en cultivo.***

Para reafirmarnos en el resultado anteriormente descrito, se llevaron a cabo experimentos de colocalización de la proteína perilipina-1 y la IgG del suero en adipocitos en cultivo. Con las células ya diferenciadas, fijadas y permeabilizadas, se incubó el suero de pacientes y controles a dilución 1/100 durante toda la noche, a 4°C. Al día siguiente, perilipina-1 se detectó empleando un anticuerpo monoclonal (#3470, *Cell Signaling Technology*) dirigido contra el aminoácido Asp418 localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Este aminoácido está presente exclusivamente en perilipina-1, de que nos aseguramos que lo que estábamos detectando era esa y no otras perilipinas.

Como se puede observar en la figura 24, la presencia de IgG procedente del suero de los pacientes con LGA (en concreto LGA1, LGA2 y LGA3) colocalizaba en su totalidad con perilipina-1 en la gota lipídica de los adipocitos en cultivo. Por el contrario, los pacientes negativos (LGA4 y LGA5) no marcaron para IgG, al igual que

## ***Resultados***

los donantes sanos. Lo mismo ocurrió con el suero de pacientes con LPA, LINS o con LES (Figura 1 de Anexos).



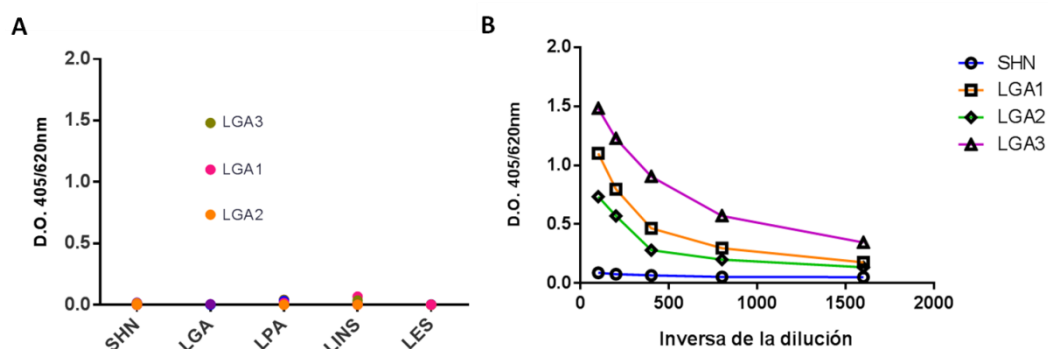
**Figura 24. Estudios de colocación de IgG humana y perilipina-1 en adipocitos humanos en cultivo.** La colocación entre IgG y perilipina-1 se muestra en la superposición de imágenes (Merge, en amarillo se muestra los puntos donde existe colocación). En azul se muestra en núcleo teñido con DAPI. Barra de escala, 18  $\mu$ m.

#### 4.3.2. Frecuencia de los anticuerpos anti-perilipina-1.

Aprovechando que contábamos con perilipina-1 recombinante (Origene), decidimos poner a punto un ensayo para la detección de autoanticuerpos dirigidos contra perilipina mediante una técnica de ELISA, como se describe en materiales y métodos.

Se analizaron las mismas muestras de suero que se ensayaron previamente por Western blot o inmunofluorescencia. Se analizaron 20 sueros de donantes sanos, 6 sueros de pacientes con LGA, 8 sueros de pacientes con LPA, 11 sueros de pacientes con LINS y 10 sueros de pacientes con LES. Cada suero se analizó por duplicado, a una dilución 1/100.

Exclusivamente se detectó reactividad en tres de los cinco pacientes con LGA (LGA1, LGA2 y LGA3), mientras que en el resto de muestras la señal fue prácticamente indetectable. Estos resultados fueron totalmente coincidentes con los obtenidos por inmunoblot e inmunofluorescencia. En la figura 25a se detallan los valores de densidad óptica de cada muestra, para cada grupo.



**Figura 25. Análisis para la detección de autoanticuerpos dirigidos contra perilipina-1 mediante ELISA.** En la imagen A se representan los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos para cada muestra de suero diluida 1/100, y por duplicado. Se analizaron 20 donantes sanos (SHN), 5 pacientes con lipodistrofia generalizada adquirida (LGA), 8 pacientes con lipodistrofia parcial adquirida (LPA), 11 pacientes con lipoatrofia por tratamiento con insulina (LINS) y 10 pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). En la imagen B se muestra la titulación de los sueros de tres pacientes con LGA positivos para anticuerpos contra perilipina-1. Para cada muestra se diseñó una curva con diluciones del suero desde 1/100 hasta 1/1600.

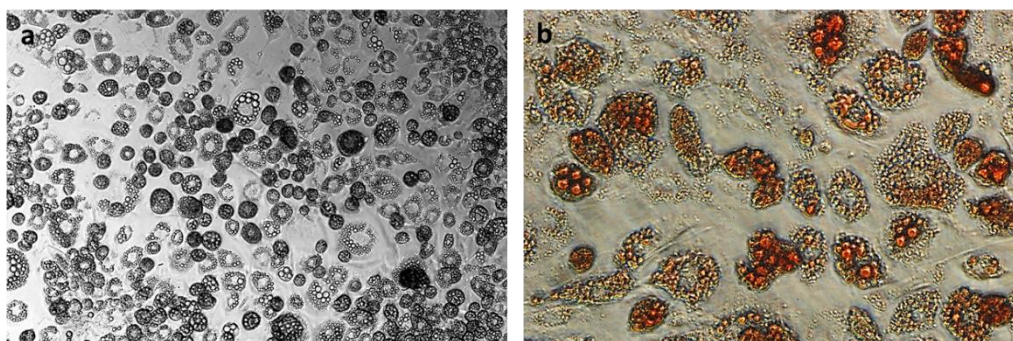
Adicionalmente decidimos titular los sueros de los tres pacientes con autoanticuerpos mediante la técnica de ELISA. Se hizo una curva con cada paciente que fue desde una dilución inicial de 1/100 a una dilución final de 1/1600. El paciente LGA3 fue el que mayor título de anticuerpos tuvo, seguido por LGA1 y en menor medida por LGA2 (Figura 25b). Así pues, se procedió a la purificación de la IgG total en los pacientes con autoanticuerpos y algunos donantes sanos por medio de cromatografía de afinidad con columnas de Proteína G. Tras el proceso la solución se concentró diez veces y se dializó en medio de cultivo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la IgG se cuantificó por nefelometría. Los resultados demostraron una eficacia de purificación superior al 80% en todos los casos.

### 4.3.3. Análisis del efecto patogénico de los autoanticuerpos anti-perilipina-1.

La sola presencia de autoanticuerpos dirigidos contra perilipina-1, una de las proteínas mayoritarias del TAB, presentes exclusivamente en pacientes con una enfermedad que afecta específicamente a este tejido, era muy sugerente; pero en ningún caso demostraba su relación directa con la patología. Por ello, como perilipina-1 juega un papel central en la regulación del proceso lipolítico en el tejido adiposo, nos propusimos analizar el efecto que estos autoanticuerpos sobre la lipólisis.

#### 4.3.3.1. Diferenciación de la línea de ratón 3T3-L1 en células adiposas.

Para estudiar el efecto patogénico de los autoanticuerpos sobre el proceso lipolítico, decidimos emplear la línea 3T3-L1. Esta línea, a diferencia de las hMSC, tiene una capacidad adipogénica mucho mayor, en periodos de tiempo menores (figura 26).



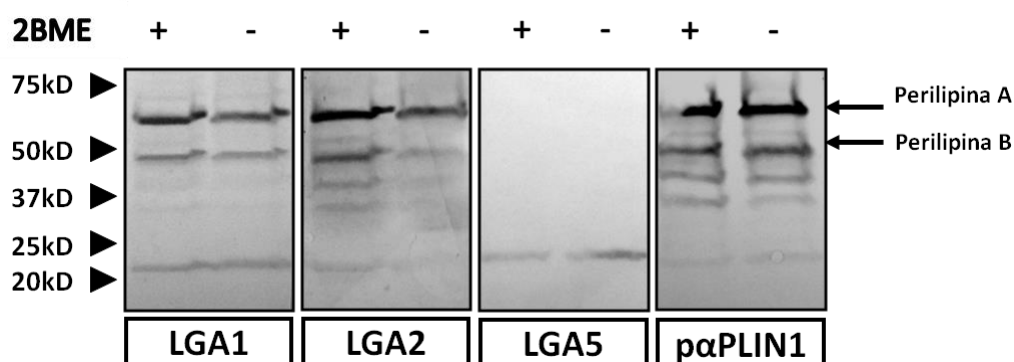
**Figura 26. Diferenciación de células de la línea 3T3-L1 hacia adipocitos.**

Pero para aceptar emplear este modelo en nuestro trabajo, primero tuvimos que comprobar si el suero de los pacientes con LGA reconocía la perilipina en extractos de

TAB mrido, y en segundo lugar, si reconocía esta proteína en células 3T3-L1 una vez diferenciadas en adipocitos.

#### 4.2.3.2. Antigenicidad de extractos de tejido adiposo de ratón.

El TAB se obtuvo de la cavidad abdominal de ratones de la especie *Mus musculus*. La obtención del extracto y el estudio de la antigenicidad del mismo se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones procedimentales que en el TAB humano. El resultado del inmunoblot se muestra en la figura 27. Los sueros de los pacientes con LGA con anticuerpos contra perilipina-1 (LGA1 y LGA2) detectaron intensamente dos proteínas de aproximadamente 55 y 45 kD, las cuales también detectó el anticuerpo policlonal dirigido contra perilipina-1 (R&D). Por el contrario, el suero de un paciente con LGA negativo para anticuerpos frente a perilipina-1 (LGA5), no mostró reactividad frente al extracto. Los pesos moleculares de las bandas que se observan en el western blot concuerdan con los tamaños conocidos para las isoformas A y B de perilipina en ratón (Greenberg *et al.*, 1993).



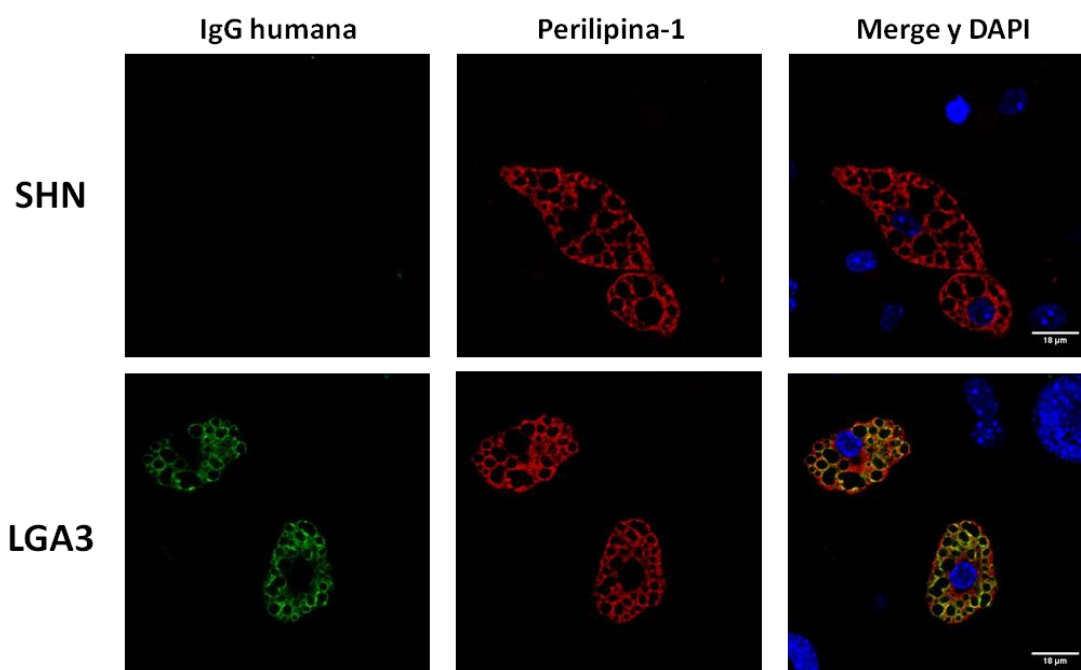
**Figura 27. Reactividades de los autoanticuerpos por western blot sobre el extracto de tejido adiposo de ratón.** Se analizó la presencia de perilipina en extractos de tejido adiposo empleando un anticuerpo policlonal específico (pαPLIN1). Simultáneamente se probaron dos sueros de pacientes positivos (LGA1 y LGA2), y uno negativo (LGA5). El patrón de bandas detectado con el anticuerpo policlonal es totalmente coincidente con el detectado con los sueros de los pacientes. Las flechas indican la isoforma A (55kD) y la isoforma B (45 kD) de perilipina descritas en ratón. 2BME hace referencia al tratamiento con (+) o sin (-) 2-mercaptoetanol.

#### 4.2.3.3. Antigenicidad de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos.

En vista del resultado anterior lo esperable era que perilipina de los adipocitos diferenciados en cultivo fuera detectada por el suero de los pacientes con LGA. Con el fin de comprobar la antigenicidad de estas células, se procedió exactamente igual a

como previamente se había hecho para colocalizar la IgG del suero y la perilipina-1 en hMSC.

El resultado, que se muestra en la figura 28, confirmó que la IgG del suero de los pacientes con LGA reaccionó frente a la gota lipídica en adipocitos de ratón, colocalizando con la proteína perilipina. Por el contrario, no se detectó colocalización con el suero de pacientes con LGA negativos para anticuerpos frente a esta proteína, así como con el suero de donantes sanos.



**Figura 28. Estudios de colocalización de IgG humana y perilipina en adipocitos da ratón en cultivo.** Los adipocitos se obtuvieron a partir de la diferenciación de la línea de ratón 3T3-L1. La colocalización entre IgG y perilipina se muestra en la superposición de imágenes (Merge, en amarillo se muestra los puntos donde existe colocalización). En azul se muestra en núcleo teñido con DAPI. Barra de escala, 18  $\mu\text{m}$ .

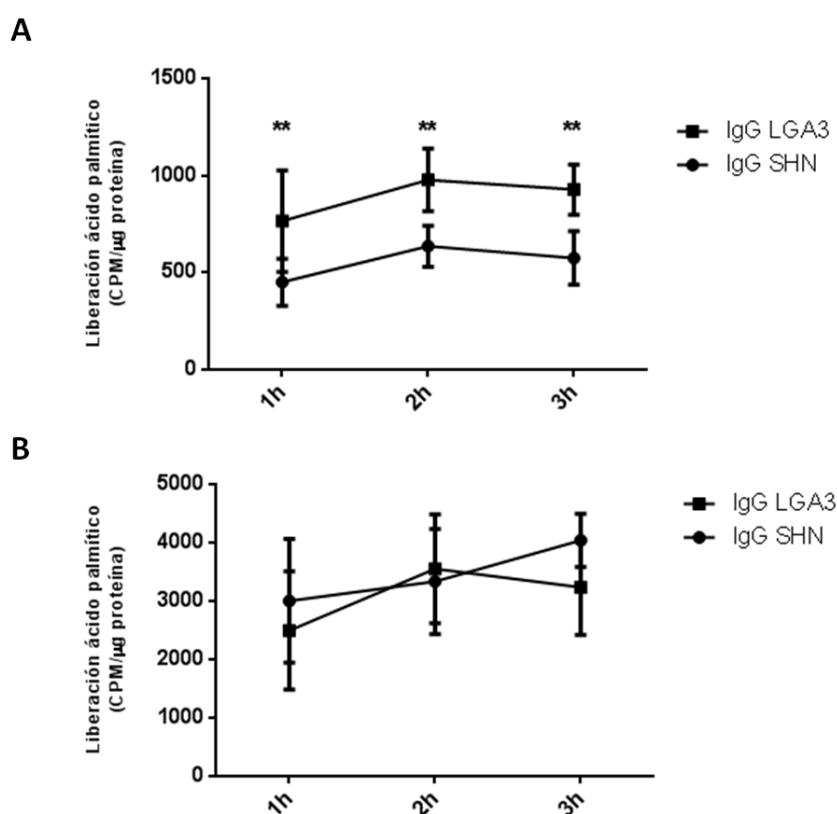
#### ***4.2.3.4. Medida de la actividad lipolítica en presencia de autoanticuerpos dirigidos contra perilipina-1.***

Inicialmente se empleó la IgG del paciente LGA3 (el de mayor título de anticuerpos) con el fin de asegurarnos un efecto mayor sobre la vía lipolítica. En ensayo se diseñó a tres tiempos, con una cantidad constante de IgG (300  $\mu\text{g}$ ) por grupo de tratamiento, en condiciones basales y estimuladas, tal y como se indica en material y métodos. Los resultados del experimento demostraron que en presencia de la IgG de LGA3, la lipólisis basal se veía significativamente incrementada a todos los tiempos

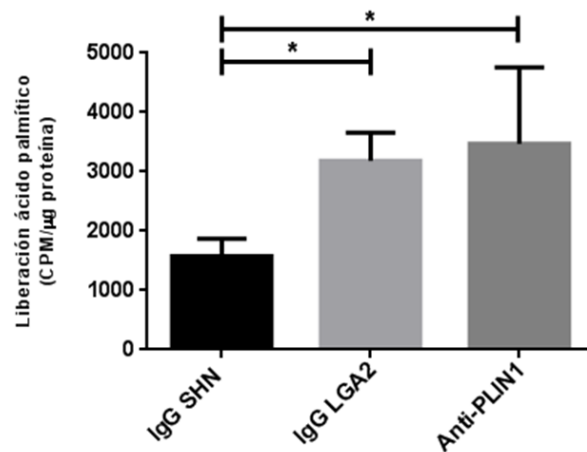


(figura 29a), mientras que la lipólisis estimulada no se veía afectada, en comparación con las células tratadas con IgG de un donante sano (figura 29b).

A continuación decidimos ensayar el efecto con los autoanticuerpos de otro paciente, LGA2, pero con más cantidad de IgG (400  $\mu$ g) y solamente a 3 horas en condiciones basales, pues ya comprobamos que la lipólisis basal estaba incrementada a todos los tiempos, y que la lipólisis estimulada no se veía afectada. Adicionalmente se incluyó un anticuerpo policlonal (R&D) dirigido contra PLIN1 como control positivo. De nuevo se comprobó que la presencia de los autoanticuerpos contra PLIN1 hace que la lipólisis basal se encuentre significativamente incrementada, con respecto al tratamiento con IgG de controles sanos. Los valores de lipólisis experimentados con el anticuerpo policlonal comercial eran también significativamente altos, tal y como ocurrió con a IgG del paciente LGA2 (Figura 30).



**Figura 29.** Lipólisis basal (A) y estimulada (B) en adipocitos de ratón tratados con IgG procedente de un paciente con LGA y un donante sano (SHN).



**Figura 30.** Lipólisis basal en adipocitos de ratón tratados con IgG de un donante sano (SHN), un paciente con LGA y un anticuerpo comercial que se une a perilipina-1 (PLIN1).

## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN PACIENTES CON LIPODISTROFIAS ADQUIRIDAS

#### 5.1.1. Estudio del perfil plasmático de componentes del complemento.

Las alteraciones en la vía alternativa del complemento son altamente frecuentes en los pacientes con LPA. En torno a un 75-90% de estos pacientes presentan hipocomplementemia C3, es decir, niveles plasmáticos de C3 muy disminuidos (Hussain *et al.*, 2016). Este parámetro, además, está ampliamente aceptado como un marcador muy importante para el diagnóstico diferencial de esta lipodistrofia (Brown *et al.*, 2016). Por otra parte, el consumo de C4 ha sido descrito en algunos casos de pacientes con LGA (Savage *et al.*, 2009; Eren *et al.*, 2010), aunque de forma esporádica en comparación con la hipocomplementemia C3.

En este trabajo exclusivamente se han detectado alteraciones en los niveles circulantes de componentes de complemento en los pacientes con LPA. En nuestra cohorte, un 75% de los pacientes con LPA presentan niveles muy bajos de C3. Estos resultados coinciden con lo descrito previamente en la bibliografía (Sissons *et al.*, 1976; Garg, 2004; Misra *et al.*, 2004; Hussain y Garg, 2016). Casualmente, tres pacientes (37,5%) tuvieron niveles de C4 por debajo del umbral de referencia (LPA1: 7,4 mg/dl, LPA2: 13,7 mg/dl y LPA5: 13,1 mg/dl). En comparación a los niveles de C3, este dato normalmente no suele reseñarse, al ser una situación marginal. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el consumo de C4 se ha relacionado más con casos de LGA. En nuestra cohorte, ninguno de los pacientes con LGA ha tenido disminuidos los niveles del componente C4, lo cual contradice con los datos en la bibliografía (Savage *et al.*, 2009; Eren *et al.*, 2010). Una de las principales diferencias entre nuestra cohorte y los pacientes descritos en los trabajos antes citados es que ninguno de los pacientes de nuestra cohorte con LGA padece hepatitis autoinmune, una enfermedad con una clara asociación a niveles disminuidos de C4 (Gregorio *et al.*, 1997; Mieli-Vergani *et al.*, 2008). De hecho, algunos trabajos vinculan que los niveles bajos de C4 podrían ser consecuencia de un silenciamiento de algún alelo del locus de C4, lo que se asocia con una susceptibilidad a padecer hepatitis autoinmune (Vergani *et al.*, 1985; Scully *et al.*, 1993; Doherty *et al.*, 1994). Además, no existen trabajos de pacientes exclusivamente

afectados por la LGA (sin hepatitis autoinmune), con niveles de C4 bajos, de modo que no está del todo claro que esta observación sea característica de la lipodistrofia, sino más bien consecuencia del propio proceso autoinmune. En este sentido, es interesante destacar que LPA1 tuvo hepatitis autoinmune como consecuencia de la infección con virus B, lo que encaja perfectamente con sus niveles tan bajos de C4.

En humanos, en condiciones fisiológicas, los niveles de ASP se mantienen relativamente estables. La generación de ASP está relacionada con la expresión de C3; tanto es así que se sabe que el tejido adiposo visceral expresa más C3, y por ende, produce más ASP que el tejido adiposo subcutáneo, principalmente para compensar la mayor actividad lipolítica del primero (Cianflone *et al.*, 2003). Este suceso transcurre de manera fisiológica y no influye de manera determinante en los niveles circulantes de ASP. Sin embargo, tras la ingesta se produce un flujo masivo de ASP desde el tejido adiposo subcutáneo al torrente circulatorio favoreciendo que los TGs y los AGs libres puedan ser almacenados en el tejido adiposo, demostrando así un importante papel regulador en el aclaramiento lipídico en situaciones postprandiales (Germinario *et al.*, 1993; Cianflone *et al.*, 2003). Otras situaciones donde los niveles de ASP están incrementados son en condiciones patológicas como la obesidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares (Germinario *et al.*, 1993; Maslowska *et al.*, 1999; Maslowska *et al.*, 2006; Fisette *et al.*, 2013).

En las lipodistrofias, y particularmente en la LPA, nunca se han medido los niveles plasmáticos de ASP. En nuestra cohorte los resultados muestran que los niveles de ASP se encuentran incrementados, aunque la variabilidad dentro del grupo es amplia, cosa que no ocurre dentro del grupo de los donantes sanos (Figura 14). El hecho de encontrar niveles plasmáticos elevados de ASP en pacientes con LPA se relaciona con el exacerbado consumo sistémico de C3 que tienen, tal y como ocurre en la cohorte de pacientes con GC3, positivos para C3NeF. Sin embargo, resulta interesante que los niveles de ASP en el grupo de pacientes con GC3 son significativamente más altos que en los pacientes con LPA, teniendo ambos un consumo de C3 similar (Figura 14). Una posible explicación a este resultado es que existan anticuerpos bloqueantes contra ASP, que se traduciría en una menor disponibilidad de esta adipoquina, lo cual cuadraría con la disminución del tejido adiposo en los pacientes con LPA, tal y como se ha demostrado que ocurre en ratones (Murray *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2007; Paglialunga *et al.*, 2008; Paglialunga *et al.*, 2010). Con todo, si consideramos que la función de ASP en

el tejido adiposo es paracrina, los niveles circulantes de esta molécula pueden no ser un reflejo de la que esté ocurriendo a nivel local en el adipocito.

### **5.1.2. Autoanticuerpos dirigidos frente a componentes de la vía alternativa del complemento.**

Como se ha comentado anteriormente, el sistema del complemento es un efector de la respuesta inmune muy potente que debe ser correctamente regulado. Una activación no controlada, por un exceso, por ocurrir en un lugar erróneo (superficies endógenas) o por una incorrecta regulación, puede provocar diversas enfermedades renales, como el síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) o GC3 (Ricklin *et al.*, 2010; Ricklin y Lambris, 2013). Lo más frecuente en estas patologías es encontrar mutaciones y/o polimorfismos en proteínas de la vía alternativa, o de forma más ocasional, autoanticuerpos que reconocen alguno de sus componentes y que pueden alterar su correcto funcionamiento (Dragon-Durey *et al.*, 2013, Jozsi *et al.*, 2014). En el caso de la GC3, el anticuerpo más frecuentemente encontrado es C3NeF, mientras que en el caso del SHUa son los dirigidos contra FH, aunque éstos también se han descritos en casos de GC3 (Skerka *et al.*, 2009).

Por su parte, C3NeF es el único autoanticuerpo que desregula complemento que ha sido descrito en los pacientes con LPA. Además, su elevada prevalencia en casos de LPA se relaciona con el intenso consumo de C3 observado (Misra *et al.*, 2004; Garg, 2004). La única evidencia del papel inmunopatológico de C3NeF se encuentra en un trabajo publicado por Mathieson y colaboradores en el año 1993. Los autores demostraron que en presencia de un suero con C3NeF (o en su caso de la IgG purificada de estos sueros), los adipocitos aislados del tejido adiposo de ratón y de humano se lisaban, lo que confirmaban por el aumento de lactato deshidrogenasa (LDH) y sC5b-9 en el medio de cultivo. Cuando se añadía a la reacción EDTA (agente quelante de cationes bivalentes que inhibe el complemento) o un anticuerpo bloqueante de FD, se producía un descenso importante de LDH y sC5b-9 (Mathieson *et al.*, 1993). A pesar de ello, el mecanismo fisiopatológico del C3NeF en la LPA es desconocido y en cierta medida, discutible. Se sabe que C3NeF no es un autoanticuerpo exclusivo de este síndrome, sino que aparece también, y en mayor proporción, en otras situaciones patológicas no asociadas a la lipodistrofia.

Dado el efecto patogénico probado de los autoanticuerpos antes nombrados, y que mutaciones en otros genes de la vía alternativa se asocian a patología renal, se han buscado autoanticuerpos frente a otras proteínas, que pudieran alterar su funcionamiento. En este sentido, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos frente al FI en pacientes de SHUa (Kavanagh *et al.*, 2012), aunque no se demostró que tuvieran un efecto sobre la función de este regulador. En la GC3 existe un caso publicado con autoanticuerpos anti-FB, que impedía la disociación de la convertasa de C3 (Strobel *et al.*, 2010), y cohortes más amplias con autoanticuerpos anti-FB y anti-C3b que producían un aumento de actividad de la convertasa (Chen *et al.*, 2011; Marinozzi *et al.*, 2017). Otro grupo ha llevado a cabo la caracterización funcional de anticuerpos anti-C3 en pacientes con nefritis lúpica, demostrando que impiden la disociación de la convertasa por acción de reguladores como FH o CR1 (Vasilev *et al.*, 2015). Sin embargo, no está claro si estos autoanticuerpos son la causa de la enfermedad o si aparecen de forma secundaria por el aumento de productos de activación del complemento que circulan en plasma (Józsi *et al.*, 2014; Blanc *et al.*, 2015; Marinozzi *et al.*, 2017).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que claramente la aparición de todos los autoanticuerpos dirigidos contra proteínas del sistema del complemento está vinculado a la detección de niveles circulantes alterados del mismo. Un ejemplo claro de esto se observa en los pacientes con LGA, ya que ninguno presentó niveles disminuidos de C3 y C4, y por ende, no se detectaron autoanticuerpos frente a componentes del complemento. En contraposición, los pacientes con LPA con un intenso consumo de C3, y de C4 en algunos casos, fueron positivos al menos para uno (o varios) de los autoanticuerpos analizados. C3NeF fue el anticuerpo más detectado en nuestra cohorte de pacientes con LPA (LPA1, LPA2, LPA3, LPA4 y LPA5, con una frecuencia del 62,5%), y aunque nuestro porcentaje es inferior a lo descrito, coincide con la bibliografía en que su frecuencia es muy elevada en estos pacientes (Misra *et al.*, 2004; Garg, 2004, Brown *et al.*, 2016). La presencia de este anticuerpo lleva asociada una predisposición a desarrollar a medio-largo plazo una enfermedad renal, lo cual explica que algunos pacientes como LPA1 y LPA3 desarrollaran una GC3 (del tipo enfermedad por depósitos densos) y una nefropatía IgA, respectivamente. Otros pacientes tuvieron algún episodio intermitente de proteinuria y hematuria, normalmente

asociado a un proceso febril-infeccioso, que acabó resolviéndose sin ninguna complicación renal severa.

Respecto al resto de autoanticuerpos analizados, no existen datos previos en cohortes de lipodistrofias, de modo que su relación con la enfermedad queda sujeta a diversas interpretaciones. Los anticuerpos contra FH fueron detectados en dos pacientes (LPA3 y LPA5), aunque a niveles bajos, por lo que su implicación en la patología es difícil de interpretar. Los anticuerpos anti-FI se detectaron en un paciente (LPA7), negativo para C3NeF pero con C3 bastante disminuido. La descripción de estos anticuerpos no ha demostrado su relación con el perfil de complemento ni con los niveles circulantes (Kavanagh *et al.*, 2012); pero en nuestro caso sería de interés realizar una caracterización funcional por ser el único anticuerpo presente. En lo que respecta a los componentes de la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3, FB y properdina) cabe destacar que fueron detectados en la mayoría de los pacientes positivos para C3NeF. En este sentido es lógico pensar que si existe autoinmunidad y la convertasa C3bBb (con o sin properdina) es el neoepítipo de C3NeF, puedan existir otros autoanticuerpos frente a proteínas de este complejo por separado. A diferencia de C3NeF, cuya relevancia en la lipodistrofia ha sido estudiada, discutida y validada, los anticuerpos frente a componentes de la convertasa de C3 nunca antes habían sido descritos, de modo que es necesario hacer más estudios para comprobar si tienen un papel en la patología o bien son consecuencia del aumento de productos circulantes de la activación del complemento.

### **5.1.3. Seguimiento del perfil del sistema del complemento en un paciente con LPA: a propósito de un caso.**

La LPA es una enfermedad extremadamente compleja. Tras más de un siglo desde su primera descripción no existen hallazgos relevantes que despejen las incógnitas sobre el mecanismo patogénico. Lo que queda claro, y así lo demuestran las numerosas publicaciones sobre esta patología, es que el sistema del complemento juega un papel clave (Mathieson *et al.*, 1993; Misra *et al.*, 2004; Garg, 2004). Con nuestros estudios, aunque no hemos abordado el mecanismo celular por el que C3NeF podría provocar la lisis de los adipocitos, hemos podido demostrar que el seguimiento del perfil de complemento (principalmente C3 y ASP) es realmente informativo desde el punto de vista clínico. Por un lado, la aparición de consumo de C3, así como la



presencia de C3NeF, son marcadores clave que apoyan el diagnóstico diferencial; de modo que la determinación de ambos parámetros debe ser realizada ante la sospecha de LPA. Adicionalmente, hemos comprobado que la desregulación del complemento, traducida por el descenso en los niveles de C3 (y el ascenso de ASP), está ligada a la progresiva pérdida cefalocaudal de TAB (Figura 16). Esto pone de relieve la importancia que tiene analizar la evolución de los niveles de C3 como biomarcador relacionado con el progreso de la lipodistrofia. Sin embargo, esto no demuestra si el sistema del complemento es el principal agente relacionado con la pérdida de tejido adiposo, o bien, por el contrario, el consumo de complemento es consecuencia del fenómeno lipodistrófico.

Actualmente existen algunas drogas con una eficacia altamente probada en mitigar o restaurar los daños producidos por la desregulación del complemento. Un ejemplo es el uso terapéutico del anticuerpo anti-C5, denominado eculizumab (Soliris®, *Alexion Pharmaceuticals*), en enfermedades mediadas por el sistema del complemento como Hemoglobinuria Paroxística Nocturna o el SHUa (Ricklin *et al.*, 2017). Existe el caso de una paciente de 14 años con GC3 (enfermedad por depósitos densos) asociada a LPA que mejoró su función renal tras recibir tratamiento con eculizumab (Ozkaya *et al.*, 2014). En lo que respecta a la GC3, los datos de la eficacia del tratamiento con eculizumab son muy heterogéneos y poco concluyentes, lo que ha impulsado el desarrollo de numerosos ensayos clínicos (Ricklin *et al.*, 2017). En el caso citado con anterioridad se demuestra que el bloqueo de C5 es de gran utilidad cuando otros tratamientos más generales, como la terapia con corticoides o la plasmaféresis, son insuficientes. Sin embargo, no existen datos en la literatura que demuestren que el tratamiento anticomplemento tenga algún beneficio sobre el tejido adiposo ni las alteraciones metabólicas (si las hubiera) en pacientes con LPA.

El abordaje terapéutico en esta patología se basa exclusivamente en la reparación cosmética. El trasplante autólogo de tejido adiposo de zonas no afectadas está considerado un tratamiento seguro y eficaz para la restauración del contorno facial y del volumen mamario, pues suelen ser las regiones más afectadas en estos pacientes (Heidemann *et al.*, 2016). Este tratamiento está justificado ya que como consecuencia de la pérdida del tejido adiposo la mayoría acaban padeciendo un trastorno psicológico grave asociado a la alteración de su aspecto físico. La experiencia al respecto es poca, de modo que es difícil predecir la duración que puede llegar a tener el injerto o cuántas

intervenciones son necesarias para conseguir una restauración aceptable; pero los efectos positivos para los pacientes están claramente demostrados por lo que se recomienda encarecidamente valorar este abordaje en todos los casos. Durante la adolescencia aumenta el riesgo de que padezcan trastornos psicológicos que pueden dificultar su vida personal y social una vez sean adultos, por lo que los expertos afirman que debería considerarse la restauración con tejido adiposo autólogo muy pronto, si es posible, durante la infancia (Brown *et al.*, 2016; Heidemann *et al.*, 2016).

## **5.2. AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL TEJIDO ADIPOSO**

La única evidencia de autoanticuerpos contra adipocitos se informó en un paciente masculino de 33 años con LGA, diabetes *mellitus* resistente a la insulina y acantosis *nigricans*. Los autores demostraron la presencia de depósitos de IgG alrededor del adipocito mediante inmunofluorescencia directa en una biopsia subcutánea del paciente (Hübler *et al.*, 1998). Sin embargo, en ese trabajo los autores no identificaron el antígeno ni llevaron a cabo ensayos para demostrar el efecto patogénico de los anticuerpos. Existe un trabajo algo más reciente donde se presentó a tres pacientes masculinos que debutaron con lipodistrofia generalizada, posterior al desarrollo de un astrocitoma pilocítico. Todos ganaron grasa corporal o peso después de la extirpación quirúrgica del tumor y/o quimioterapia, por lo que los autores hipotetizaron que el tumor originó anticuerpos anti-adipocito, que podrían haber inducido la lisis de los adipocitos (Patni *et al.*, 2016). No obstante, los autores no probaron la existencia de anticuerpos específicos frente al tejido adiposo.

En nuestro estudio hemos puesto de manifiesto la existencia de un nuevo autoanticuerpo dirigido contra el tejido adiposo, exclusivamente presente en pacientes con LGA. El autoantígeno que reconocen estos anticuerpos es la perilipina-1, una proteína mayoritaria en el TAB del adulto, con un papel muy importante en el control de la vía lipolítica en el adipocito. Si se compara el patrón de inmunofluorescencia en tejido adiposo obtenido con los pacientes de nuestra cohorte, se puede concluir que es coincidente con el que mostraron Hübler y colaboradores con su paciente (Hübler *et al.*, 1998). La frecuencia de estos anticuerpos en nuestra cohorte fue del 60%, detectándose exclusivamente en pacientes del subtipo autoinmune. Sin embargo, es posible que los datos estén sesgados debido a que hay pocos pacientes del subtipo idiopático (el cual suele representar el 50% de los casos) y ninguno del subtipo asociado a paniculitis. El

hecho de que no se hayan detectado anticuerpos contra el tejido adiposo en ningún paciente con LGA idiopática, sitúa a los pacientes de este subtipo como candidatos para la búsqueda de nuevos marcadores genéticos de LGC. Por otra parte, sería de interés analizar la presencia de autoanticuerpos en pacientes con LGA asociada a paniculitis, pues suele ir acompañada de enfermedades autoinmunes, aunque en menor frecuencia que la LGA autoinmune.

En otro paso por caracterizar los anticuerpos anti-perilipina-1, hemos analizado el efecto patogénico de éstos, demostrando claramente su relación con la enfermedad. Como se ha explicado con anterioridad, el ratón KO para perilipina padece, principalmente, una disminución del 30% al 70% de la masa de tejido adiposo, un descenso de la capacidad de los adipocitos para almacenar triglicéridos y un incremento significativo de la lipólisis basal (Tansey *et al.*, 2001; Zhai *et al.*, 2010). En humanos, las mutaciones en esta proteína se han relacionado con la LFP tipo 4 (MIM#613877). Estas mutaciones provocan un cambio del marco de lectura en el C-terminal de la proteína, generando un extremo aberrante que pierde su función para controlar el proceso lipolítico en condiciones basales (Gandotra *et al.*, 2011a; Gandotra *et al.*, 2011b; Kozusko *et al.*, 2015).

Los ensayos *in vitro* de lipólisis que hemos llevado a cabo ponen de manifiesto que en presencia de los autoanticuerpos contra perilipina-1 se produce un incremento significativo de la lipólisis basal, y no de la estimulada (Figura 29 y 30), tal y como ocurre en los pacientes con LFP tipo 4 (Gandotra *et al.*, 2011a; Gandotra *et al.*, 2011b; Kozusko *et al.*, 2015). Aunque no hemos abordado los mecanismos moleculares por los que la lipólisis basal está incrementada, lo más probable es que el autoanticuerpo produzca un bloqueo de la actividad reguladora negativa de la perilipina-1 sobre la vía lipolítica. Tal y como ocurre en los pacientes con LFP tipo 4 y en los ratones KO-perilipina, si el anticuerpo impide que perilipina-1 mantenga secuestrado CGI-58, la lipólisis se mantendrá continuamente activada. Sin embargo, la lipodistrofia de nuestra cohorte es generalizada, a diferencia de lo descrito en los pacientes con mutaciones en el gen *PLIN1*. En ratón, sin embargo, los resultados son bastante heterogéneos, pues hay trabajos donde el KO para perilipina pierde en torno a un 30% de la masa de tejido adiposo, mientras que en otros la disminución está en torno al 70%, lo cual se asemeja más a un fenotipo generalizado. Una posible explicación sobre las discrepancias en el fenotipo de los pacientes con LGA con anticuerpos contra perilipina-1 respecto de los

pacientes con LFP tipo 4, es que los autoanticuerpos, al ser policlonales bloquean la molécula en más dominios funcionalmente relevantes, mientras que en el otro caso, la mutación solamente afecta a una parte de la proteína, lo cual puede tener un efecto menos agresivo.

Las terapias actuales previenen o disminuyen las comorbilidades de los síndromes lipodistróficos. Sin embargo, no existe cura para los mismos ni los tratamientos existentes logran que la masa de TAB se recupere.

Aparte de la dieta y el ejercicio, la aplicación de la leptina recombinante (Metreleptin®, *Agerion Pharmaceuticals*) en todas las lipodistrofias de tipo generalizado, y en los tipos de lipodistrofias parciales con hipoleptinemia, ha cambiado muy positivamente la calidad de vida de estos pacientes. Entre los principales beneficios para los pacientes se encuentran: disminución de la hiperfagia, disminución del porcentaje de la HbA1c, disminuciones de en torno al 60% de los niveles de TGs, disminuciones importantes de colesterol total y colesterol-LDL, reducción de la esteatosis hepática y normalización de la proteinuria en los casos donde haya afectación renal (Brown *et al.*, 2016).

Las alteraciones en la vía lipolítica abren un abanico de posibilidades para tratamientos más correctamente dirigidos. Los autores que describieron la LPF tipo 4 ya proponían que estos pacientes podrían beneficiarse de tratamientos con inhibidores de la lipólisis, como acipimox (Gandotra *et al.*, 2011a; Gandotra *et al.*, 2011b; Kozusko *et al.*, 2015). Del mismo modo, los pacientes con anticuerpos frente a perilipina-1, con una lipólisis basal incrementada, podrían ser candidatos a este tipo de tratamiento. Adicionalmente se podrían plantear otras vías de actuación que suelen emplearse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la terapia inmunosupresora, encargada de reducir o eliminar el anticuerpo causante de la enfermedad.

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con LPA presentan un perfil de complemento caracterizado por un descenso muy acusado de C3, y de C4 en algunos casos. Por el contrario, los pacientes con LGA no presentan alteraciones del sistema del complemento.
2. Los niveles de ASP en los pacientes con LPA se encuentran elevados, probablemente relacionado con el consumo de C3. Sin embargo, estos niveles son significativamente más bajos en comparación con pacientes con GC3, con un consumo de C3 similar.
3. Se ha analizado la presencia de autoanticuerpos que desregulan la vía alternativa del sistema del complemento en pacientes con LPA. Los resultados muestran que aunque C3NeF es el anticuerpo más frecuente, se han detectado otros anticuerpos frente a componentes y/o reguladores de la vía alternativa (C3, FB, properdina, FH y FI).
4. El seguimiento del perfil de complemento en pacientes con LPA, ejemplificado con los niveles de C3 y ASP, evidencia que es un biomarcador que se relaciona estrechamente con la progresión de la lipodistrofia.
5. Se han detectado y caracterizado unos autoanticuerpos dirigidos contra el tejido adiposo en pacientes con LGA.
6. El único antígeno presente en el TAB que es reconocido por los anticuerpos detectados en el suero de los pacientes con LGA ha sido identificado como perilipina-1.
7. Los autoanticuerpos frente a perilipina-1, presentes exclusivamente en los pacientes con LGA autoinmune, provocan un incremento significativo de la lipólisis basal *in vitro* en adipocitos de ratón, lo que creemos que contribuye al desarrollo del fenotipo lipodistrófico.
8. La existencia de estos autoanticuerpos frente a proteínas del tejido adiposo, con repercusiones funcionales sobre la regulación de la vía lipolítica, abre la posibilidad en cuanto a la elección de tratamientos antilipolíticos más específicos en estos pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ailhaud, G., Grimaldi, P., Negrel, R. 1992, "Cellular and molecular aspects of adipose tissue development". *Annual Review of Nutrition*, vol. 12, pp. 207-233.
- Akinci, B., Koseoglu, F.D., Onay, H., Yavuz, S., Altay, C., Simsir, I.Y., Ozisik, S., Demir, L., Korkut, M., Yilmaz, N., Ozen, S., Akinci, G., Atik, T., Calan, M., Secil, M., Comlekci, A., Demir, T. 2015, "Acquired partial lipodystrophy is associated with increased risk for developing metabolic abnormalities". *Metabolism*, vol 64, no. 9, pp. 1086-1095.
- Ameer, F., Scandiuizzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N. 2014, "De novo lipogenesis in health and disease". *Metabolism*, vol. 63, no. 7, pp. 895-902.
- Avram, M.M., Avram, A.S., James, W.D. 2007, "Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell". *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 56, no. 3, pp. 472-492.
- Berry, D.C., Stenesen, D., Zeve, D., Graff, J.M. 2013, "The developmental origins of adipose tissue". *Development*, vol. 140, no. 19, pp. 3939-3949.
- Blanc, C., Togarsimalemath, S.K., Chauvet, S., Le Quintrec, M., Moulin, B., Buchler, M., Jokiranta, T.S., Roumenina, L.T., Fremeaux-Bacchi, V., Dragon-Durey, M.A. 2015, "Anti-factor H autoantibodies in C3 glomerulopathies and in atypical hemolytic uremic syndrome: one target, two diseases". *Journal of Immunology*, vol. 194, no. 11, pp. 5129-1538.
- Blatt, A.Z., Pathan, S., Ferreira, V.P. 2016, "Properdin: a tightly regulated critical inflammatory modulator". *Immunological Reviews*, vol. 274, no. 1, pp. 172-190.
- Bradford, M.M. 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254.
- Brasaemle, D.L. 2007, "Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis". *Journal of Lipid Research*, vol. 48, no. 12, pp. 2547-2559.



- Brown, R.J., Araujo-Vilar, D., Cheung, P.T., Dunger, D., Garg, A., Jack, M., Mungai, L., Oral, E.A., Patni, N., Rother, K.I., von Schnurbein, J., Sorkina, E., Stanley, T., Vigouroux, C., Wabitsch, M., Williams, R., Yorifuji, T. 2016, "The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 101, no. 12, pp. 4500-4511.
- Cannon, B., Nedergaard, J. 2004, "Brown adipose tissue: Function and physiological significance". *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 1, pp. 277-359.
- Chen, Q., Muller, D., Rudolph, B., Hartmann, A., Kuwertz-Broking, E., Wu, K., Kirschfink, M., Skerka, C. & Zipfel, P.F. 2011, "Combined C3b and factor B autoantibodies and MPGN type II", *The New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 24, pp. 2340-2342.
- Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., Kim, J.B. 2016, "Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders". *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, vol. 7, pp. 30. doi: 10.3389/fendo.2016.00030. eCollection 2016.
- Choy, L.N., Rosen, B.S., Spiegelman, B.M. 1992, "Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose tissue". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 18, pp. 12736-12741.
- Choy, L.N., Spiegelman, B.M. 1996, "Regulation of alternative pathway activation and C3a production by adipose cells". *Obesity Research*, vol. 4, no. 6, pp. 521-532.
- Cianflone, K., Xia, Z., Chen, L.Y. 2003, "Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1609, no. 2, pp. 127-143.
- Cianflone, K.M., Sniderman, A.D., Walsh, M.J., Vu, H.T., Gagnon, J., Rodriguez, M.A. 1989, "Purification and characterization of acylation stimulating protein". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 1, pp. 426-430.
- Cook, K.S., Min, H.Y., Johnson, D., Chaplinsky, R.J., Flier, J.S., Hunt, C.R., Spiegelman, B.M. 1987, "Adipsin: a circulating serine protease homolog

- secreted by adipose tissue and sciatic nerve". *Science*, vol. 237, no. 4813, pp. 402-405.
- Cui, W., Paglialunga, S., Kalant, D., Lu, H., Roy, C., Laplante, M., Deshaies, Y., Cianflone, K. 2007, "Acylation-stimulating protein/C5L2-neutralizing antibodies alter triglyceride metabolism in vitro and in vivo". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 293, no. 6, pp. 1482-1491.
- Cui, W., Simaan, M., Laporte, S., Lodge, R., Cianflone, K. 2009, "C5a- and ASP-mediated C5L2 activation, endocytosis and recycling are lost in S323I-C5L2 mutation". *Molecular Immunology*, vol. 46, no. 15, pp. 3086-3098.
- de Lucas-Collantes, C., Pozo-Román, J., Aparicio-López, C., de Prada-Vicente, I., Argente, J. 2016, "Acquired partial lipodystrophy (Barraquer-Simons syndrome) and IgA nephropathy". *Nefrología*, vol. 36, no. 5, pp. 556-558.
- Doherty, D., Underhill, J.A., Donaldson, P.T., Manabe, K., Mieli-Vergani, G., Eddleston, A.L., Vergani, D., Demaine, A.G., Williams, R. 1994, "Polymorphism in the human complement C4 genes and genetic susceptibility to autoimmune hepatitis". *Autoimmunity*, vol. 18, no. 4, pp. 243-249.
- Dragon-Durey, M.A., Blanc, C., Marinozzi, M.C., van Schaarenburg, R.A. & Trouw, L.A. 2013, "Autoantibodies against complement components and functional consequences", *Molecular Immunology*, vol. 56, no. 3, pp. 213-221.
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Sul, H.S. 2007, "Regulation of lipolysis in adipocytes". *Annual Review of Nutrition*, vol. 27, pp. 79-101.
- Eren, E., Özkan, T.B., Çakır, E.D., Sağlam, H., Tarım, Ö. 2010, "Acquired generalized lipodystrophy associated with autoimmune hepatitis and low serum C4 level". *Journal Of Clinical Research In Pediatric Endocrinology*, vol. 2, no. 1, pp. 39-42.
- Esteve Ràfols, M. 2014, "Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity". *Endocrinología y Nutrición*, vol. 61, no. 2, pp. 100-112.

- Fasshauer, M., Blüher, M. 2015, "Adipokines in health and disease". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 36, no. , pp. 461-470.
- Fisette, A., Lapointe, M., Cianflone, K. 2013, "Obesity-inducing diet promotes acylation stimulating protein resistance". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 437, no. 3, pp. 403-407.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H., Belfrage, P. 1986, "Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocytes triacylglycerol". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 876, no. 2, pp. 288-293.
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.A., Fernández, S., Rodríguez, A. 2014, "Regulation of adipocyte lipolysis". Nutrition Research Reviews, vol. 27, no. 1, pp. 63-93.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y. 2008, "Lipid droplets: a classic organelle with new outfits". Histochemistry and Cell Biology, vol. 130, no. 2, pp. 263-279.
- Gandotra, S., Le Dour, C., Bottomley, W., Cervera, P., Giral, P., Reznik, Y., Charpentier, G., Auclair, M., Delépine, M., Barroso, I., Semple, R.K., Lathrop, M., Lascols, O., Capeau, J., O'Rahilly, S., Magré, J., Savage, D.B., Vigouroux, C. 2011a, "Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy". New England Journal of Medicine, vol. 364, no. 8, pp. 740-748.
- Gandotra, S., Lim, K., Grousse, A., Saudek, V., O'Rahilly, S., Savage, D.B. 2011b, "Human frame shift mutations affecting the carboxyl terminus of perilipin increase lipolysis by failing to sequester the adipose triglyceride lipase (ATGL) coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5)". The Journal of Biological Chemistry, vol. 286, no. 40, pp. 34998-35006.
- Garg, A. 2004, "Acquired and inherited lipodystrophies". New England Journal of Medicine, vol. 350, no. 12, pp.1220-1234.
- Gauvreau, D., Roy, C., Tom, F.Q., Lu, H., Miegueu, P., Richard, D., Song, W.C., Stover, C., Cianflone, K. 2012, "A new effector of lipid metabolism:

- complement factor properdin". *Molecular Immunology*, vol. 51, no. 1, pp. 73-81.
- Gellis, S.S., Green, S., Walker, D. 1958, "Chronic renal disease in children with lipodystrophy". *The American Journal of Diseases in Children*, vol. 96, pp. 605-606.
- Germinario, R., Sniderman, A.D., Manuel, S., Lefebvre, S.P., Baldo, A., Cianflone, K. 1993, "Coordinate regulation of triacylglycerol synthesis and glucose transport by acylation-stimulating protein". *Metabolism*, vol. 42, no. 5, pp. 574-580.
- Gesta, S., Tseng, Y.H., Kahn, C.R. 2007, "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source". *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 242-256.
- González-Yanes, C., Sánchez-Margalet, V. 2006, "Signalling mechanisms regulating lipolysis". *Cell Signalling*, vol. 18, no. 4, pp. 401-408.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Krishnamoorthy, R., Rathod, M. 2009, "Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl)". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 50, pp. 34538-34544.
- Green, H. and Meuth, M. 1974, "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture". *Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 127-133.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C. 1991, "Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 17, pp. 11341-11346.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Moos, M.C. Jr., Londos, C., Kimmel, A.R. 1993, "Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90, no. 24, pp. 12035-12039.
- Gregoire, F.M. 2001, "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell". *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, vol. 226, no. 11, pp. 997-1002.

- Gregorio, G.V., Portmann, B., Reid, F., Donaldson, P.T., Doherty, D.G., McCartney, M., Mowat, A.P., Vergani, D., Mieli-Vergani, G. 1997, "Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience". *Hepatology*, vol. 25, no. 3, pp. 541-547.
- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., Czech, M.P. 2008, "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 5, pp. 367-377.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., Zechner, R. 2002, "Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 7, pp. 4806-4815.
- Harris, C.L., Heurich, M., Rodriguez de Cordoba, S., Morgan, B.P. 2012, "The complotype: dictating risk for inflammation and infection". *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 10, pp. 513-521.
- Hashemi, H.F., Goodman, J.M. 2015, "The life cycle of lipid droplets". *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 33, pp. 119-124.
- Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., Martin, R.J. 2001, "The biology of white adipocyte proliferation". *Obesity Reviews*, vol. 2, no. 4, pp. 239-254.
- Heidemann, L.N., Thomsen, J.B., Sørensen, J.A. 2016, "Barraquer-Simons syndrome: a unique patient's perspective on diagnosis, disease progression and recontouring treatment". *BMJ Case Reports*, pii: bcr2016216134. doi: 10.1136/bcr-2016-216134.
- Hübler, A., Abendroth, K., Keiner, T., Stöcker, W., Kauf, E., Hein, G., Stein, G. 1998, "Dysregulation of insulin-like growth factors in a case of generalized acquired lipoatrophic diabetes mellitus (Lawrence Syndrome) connected with autoantibodies against adipocyte membranes". *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, vol. 106, no. 1, pp. 79-84.
- Hussain, I., and Garg, A. 2016, "Lipodystrophy Syndromes". *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, vol. 45, no. 4, pp. 783-797.

- Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S., Sasabe, N. 2017, "Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins". *Lipids in Health and Disease*, vol. 16, no. 1, pp. 83.
- Jéru, I., Vazier, C., Araujo-Vilar, D., Vigouroux, C., Lascols, O. 2016, "Clinical Utility Gene Card for: Congenital Generalized Lipodystrophy". *European Journal of Human Genetics*, vol. 24, no. 11.
- Jéru, I., Vazier, C., Araujo-Vilar, D., Vigouroux, C., Lascols, O. 2017, "Clinical Utility Gene Card for: Familial partial Lipodystrophy". *European Journal of Human Genetics*, vol. 25, no. 2.
- Joshi, A.S., Zhang, H., Prinz, W.A. 2017, "Organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum". *Nature Cell Biology*, vol. 19, no. 8, pp. 876-882.
- Józsi, M., Reuter, S., Nozal, P., López-Trascasa, M., Sánchez-Corral, P., Prohászka, Z., Uzonyi, B. 2014, "Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome". *Immunology Letters*, vol. 160 no. 2, pp. 163-71.
- Kajimura, S. 2017, "Adipose tissue in 2016: Advances in the understanding of adipose tissue biology". *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 13, no. 2, pp. 69-70.
- Kalant, D., Cain, S.A., Maslowska, M., Sniderman, A.D., Cianflone, K., Monk, P.N. 2003, "The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acetylation-stimulating protein". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 13, pp. 11123-11129.
- Kalant, D., MacLaren, R., Cui, W., Samanta, R., Monk, P.N., Laporte, S.A., Cianflone, K. 2005, "C5L2 is a functional receptor for acylation-stimulating protein". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 25, pp. 23936-23944.
- Kavanagh, D., Pappworth, I.Y., Anderson, H., Hayes, C.M., Moore, I., Hunze, E.M., Bennaceur, K., Roversi, P., Lea, S., Strain, L., Ward, R., Plant, N., Nailescu, C., Goodship, T.H. & Marchbank, K.J. 2012, "Factor I autoantibodies in patients with atypical hemolytic uremic syndrome: disease-associated or an epiphenomenon?", *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 7, no. 3, pp. 417-426.

- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. 2004, "Adipose tissue as an endocrine organ". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 89, no. 6, pp. 2548-2556.
- Kimmel, A.R., Brasaemle, D.L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., Londos, C. 2010, "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins". *The Journal of Lipid Research*, vol. 51, no. 3, pp. 468-471.
- Kimmel, A.R., Sztalryd, C. 2016, "The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis". *Annual Review of Nutrition*, vol. 36, pp. 471-509.
- Kozusko, K., Tsang, V., Bottomley, W., Cho, Y.H., Gandotra, S., Mimmack, M.L., Lim, K., Isaac, I., Patel, S., Saudek, V., O'Rahilly, S., Srinivasan, S., Greenfield, J.R., Barroso, I., Campbell, L.V., Savage, D.B. 2015, "Clinical and molecular characterization of a novel PLIN1 frameshift mutation identified in patients with familial partial lipodystrophy". *Diabetes*, vol. 64, no. 1, pp. 299-310.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H.W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D.E., Mann, M., Farese, R.V. Jr., Walther, T.C. 2011, "Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase". *Cell Metabolism*, vol. 14, no. 4, pp. 504-515.
- Langin, D. 2006, "Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome". *Pharmacological Research*, vol. 53, no. 6, pp. 482-491.
- Lawrence, R.D. 1946, "Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances; a case throwing new light on the action of insulin". *Lancet*, vol. 1, no. 6404, pp. 773.
- Le Lay, S., Dugail, I. 2009, "Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome". *Progress in Lipid Research*, vol. 48, no. 3-4, pp. 191-195.
- Lightbourne, M., and Brown, R.J. 2017, "Genetics of Lipodystrophy". *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, vol. 46, no. 2, pp. 539-554.

- Luo, L., and Liu, M. 2016, "Adipose tissue in control of metabolism". *Journal of Endocrinology*, vol. 231, no. 3, pp. R77-R99.
- MacDougald, O.A., and Mandrup, S. 2002, "Adipogenesis: forces that tip the scales". *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 13, no. 1, pp. 5-11.
- Macpherson, R.E., Vandenboom, R., Roy, B.D., Peters, S.J. 2013, "Skeletal muscle PLIN3 and PLIN5 are serine phosphorylated at rest and following lipolysis during adrenergic or contractile stimulation". *Physiological Reports*, vol. 1, no. 4, pp. e00084.
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., Brasaemle, D.L. 2006, "The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 17, pp. 11901-11909.
- Marinozzi, M.C., Roumenina, L.T., Chauvet, S., Hertig, A., Bertrand, D., Olagne, J., Frimat, M., Ulinski, T., Deschênes, G., Burtey, S., Delahousse, M., Moulin, B., Legendre, C., Frémeaux-Bacchi, V., Le Quintrec, M. 2017, "Anti-Factor B and Anti-C3b Autoantibodies in C3 Glomerulopathy and Ig-Associated Membranoproliferative GN". *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 28, no. 5, pp. 1603-1613.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.H., Chan, L. 2000, "Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice". *Nature Genetics*, vol. 26, no. 4, pp. 474-479.
- Maslowska, M., Legakis, H., Assadi, F., Cianflone, K. 2006, "Targeting the signaling pathway of acylation stimulating protein". *The Journal of Lipid Research*, vol. 47, no. 3, pp. 643-652.
- Maslowska, M., Vu, H., Phelis, S., Sniderman, A.D., Rhode, B.M., Blank, D., Cianflone, K. 1999, "Plasma acylation stimulating protein, adipsin and lipids in non-obese and obese populations". *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 29, no. 8, pp. 679-686.



- Mathieson, P.W., Würzner, R., Oliveria, D.B., Lachmann, P.J., Peters, D.K. 1993, "Complement-mediated adipocyte lysis by nephritic factor sera". *Journal of Experimental Medicine*, vol. 177, no. 6, pp. 1827-1831.
- Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. 2008, "Autoimmune paediatric liver disease". *World Journal of Gastroenterology*, vol. 7, no. 21, pp. 3360-3367.
- Milan, G., Murano, I., Costa, S., Pianta, A., Tiengo, C., Zulato, E., Centobene, C., Bruttomesso, D., Cinti, S., Vettor, R. 2010, "Lipoatrophy induced by subcutaneous insulin infusion: ultrastructural analysis and gene expression profiling". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 95, no. 7, pp. 3126-3132.
- Min, H.Y., Spiegelman, B.M. 1986, "Adipsin, the adipocyte serine protease: gene structure and control of expression by tumor necrosis factor". *Nucleic Acids Research*, vol. 14, no. 22, pp. 8879-8892.
- Mishra, S., Khaddaj, R., Cottier, S., Stradalova, V., Jacob, C., Schneider, R. 2016, "Mature lipid droplets are accessible to ER luminal proteins". *Journal of Cell Science*, vol. 129, no. 20, pp. 3803-3815.
- Misra, A., and Garg, A. 2003, "Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature". *Medicine (Baltimore)*, vol. 82, no. 2, pp. 129-146.
- Misra, A., Peethambaram, A., Garg, A. 2004, "Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature". *Medicine (Baltimore)*, vol. 83, no. 1, pp. 18-34.
- Mitchell, S.W. 1885, "Singular case of absence of adipose matter in the upper half of the body". *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 90, no. , pp. 105-106.
- Miyoshi, H., Perfield, J.W. 2nd., Souza, S.C., Shen, W.J., Zhang, H.H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., Greenberg, A.S. 2007, "Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 2, pp. 996-1002.

- Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., Thiele, C. 2011, "Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 24, pp. 21330-21339.
- Murphy, D.J. 2012, "The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals". *Protoplasma*, vol. 249, no. 3, pp. 541-585.
- Murray, I., Havel, P.J., Sniderman, A.D., Cianflone, K. 2000, "Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein". *Endocrinology*, vol. 141, no. 3, pp. 1041-1049.
- Napolitano, A., Lowell, B.B., Damm, D., Leibel, R.L., Ravussin, E., Jimerson, D.C., Lesem, M.D., Van Dyke, D.C., Daly, P.A., Chatis, P., *et al.* 1994, "Concentrations of adiponin in blood and rates of adiponin secretion by adipose tissue in humans with normal, elevated and diminished adipose tissue mass". *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, vol. 18, no. 4, pp. 213-218.
- Nedegaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B. 2007, "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 293, no. 2, pp. E444-452.
- Nielsen, T.S., Jessen, N., Jørgensen, J.O., Møller, N., Lund, S. 2014, "Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease". *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 52, no. 3, pp. R199-222.
- Ozkaya, O., Nalcacioglu, H., Tekcan, D., Genc, G., Meydan, B.C., Ozdemir, B.H., Baysal, M.K., Keceligil, H.T. 2014, "Eculizumab therapy in a patient with dense-deposit disease associated with partial lipodystrophy". *Pediatric Nephrology*, vol. 29, no. 7, pp. 1283-1287.
- Pagialunga, S., Fisette, A., Munkonda, M., Gao, Y., Richard, D., Cianflone, K. 2012, "The effects of acylation stimulating protein supplementation VS antibody neutralization on energy expenditure in wildtype mice". *BMC Physiology*, vol. 10, pp. 4.

- Paglialunga, S., Fisette, A., Yan, Y., Deshaies, Y., Brouillette, J.F., Pekna, M., Cianflone, K. 2008, "Acylation-stimulating protein deficiency and altered adipose tissue in alternative complement pathway knockout mice". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 294, no. 3, pp. E521-529.
- Patel, S., Yang, W., Kozusko, K., Saudek, V., Savage, D.B. 2014, "Perilipins 2 and 3 lack a carboxy-terminal domain present in perilipin 1 involved in sequestering ABHD5 and suppressing basal lipolysis". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 25, pp. 9163-9168.
- Patni, N., Alves, C., von Schnurbein, J., Wabitsch, M., Tannin, G., Rakheja, D., Garg, A. 2015, "A Novel Syndrome of Generalized Lipodystrophy Associated With Pilocytic Astrocytoma". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 100, no. 10, pp. 3603-3606.
- Peake, P.W., O'Grady, S., Pussell, B.A., Charlesworth, J.A. 1997, "Detection and quantification of the control proteins of the alternative pathway of complement in 3T3-L1 adipocytes". *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 27, no. 11, pp. 922-927.
- Penno, A., Hackenbroich, G., Thiele, C. 2013, "Phospholipids and lipid droplets". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1831, no. 3, pp. 589-594.
- Pol, A., Gross, S.P., Parton, R.G. 2014, "Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites". *The Journal of Cell Biology*, vol. 204, no. 5, pp. 635-646.
- Poppelreuther, M., Rudolph, B., Du, C., Großmann, R., Becker, M., Thiele, C., Eehalt, R., Füllekrug, J. 2012, "The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake". *The Journal of Lipid Research*, vol. 53, no. 5, pp. 888-900.
- Poursharifi, P., Lapointe, M., Pétrin, D., Devost, D., Gauvreau, D., Hébert, T.E., Cianflone, K. 2013, "C5L2 and C5aR interaction in adipocytes and macrophages: insights into adipoinmunology". *Cell Signalling*, vol. 25, no. 4, pp. 910-918.

- Radermecker, R.P., Piérard, G.E., Scheen, A.J. 2007, "Lipodystrophy reactions to insulin: effects of continuous insulin infusion and new insulin analogs". *American Journal of Clinical Dermatology*, vol. 8, no. 1, pp. 21-28.
- Ramirez-Zacarias, J.L., Castro-Munozledo, F., Kuri-Harcuch, W. 1992, "Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O". *Histochemistry*, vol. 97, no. 6, pp. 493-497.
- Reeves, W.G., Allen, B.R., Tattersall, R.B. 1980, "Insulin-induced lipoatrophy: evidence for an immune pathogenesis". *The BMJ*, vol. 1, no. 6230, pp. 1500-1506
- Ricklin, D., and Lambris, J.D. 2013, "Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms". *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 190, no. 8, pp. 3831-3838.
- Ricklin, D., Barratt-Due, A., Mollnes, T.E. 2017, "Complement in clinical medicine: Clinical trials, case reports and therapy monitoring". *Molecular Immunology*, vol. 89, pp. 10-21.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J.D. 2010, "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis". *Nature immunology*, vol. 11, no. 9, pp. 785-797.
- Riordan, N.H., Ichim, T.E., Min, W.P., Wang, H., Solano, F., Lara, F., Alfaro, M., Rodriguez, J.P., Harman, R.J., Patel, A.N., Murphy, M.P., Lee, R.R., Minev, B. 2009, "Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis". *Journal of Translational Medicine*, vol. 7, pp. 29.
- Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., Friedman, J.M. 2008, "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo". *Cell*, vol. 135, no. 2, pp. 240-249.
- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.M., Guertin, D.A. 2016, "Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity". *Trends in Cell Biology*, vol. 26, no. 5, pp. 313-326.
- Savage, D.B., Semple, R.K., Clatworthy, M.R., Lyons, P.A., Morgan, B.P., Cochran, E.K., Gorden, P., Raymond-Barker, P., Murgatroyd, P.R., Adams, C., Scobie, I.,

- Mufti, G.J., Alexander, G.J., Thiru, S., Murano, I., Cinti, S., Chaudhry, A.N., Smith, K.G., O'Rahilly, S. 2009, "Complement abnormalities in acquired lipodystrophy revisited". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 94, no. 1, pp. 10-16.
- Scully, U., Toze, C., Sengar, D.P.S., Goldstein, R. 1993, "Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion". *Gastroenterology*, vol. 104, no. 5, pp. 1478-1484.
- Sembongi, H., Miranda, M., Han, G.S., Fakas, S., Grimsey, N., Vendrell, J., Carman, G.M., Siniossoglou, S. 2013, "Distinct roles of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2 during adipogenesis and lipid droplet biogenesis in 3T3-L1 cells". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 48, pp. 34502-34513.
- Shen, W.J., Patel, S., Miyoshi, H., Greenberg, A.S., Kraemer, F.B. 2009, "Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis". *The Journal of Lipid Research*, vol. 50, no. 11, pp. 2306-2313.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., Naaz, A. 2007, "Obesity, inflammation, and insulin resistance". *Gastroenterology*, vol. 132, no. 6, pp. 2169-2180.
- Siervogel, R.M., Demerath, E.W., Schubert, C., Remsberg, K.E., Chumlea, W.C., Sun, S., Czerwinski, S.A., Towne, B. 2003, "Puberty and body composition". *Hormone Research*, vol. 60, no. Suppl 1, pp. 36-45.
- Sissons, J.G., West, R.J., Fallows, J., Williams, D.G., Boucher, B.J., Amos, N., Peters, D.K. 1976, "The complement abnormalities of lipodystrophy". *The New England Journal of Medicine*, vol. 294, no. 9, pp. 461-465.
- Skerka, C., Licht, C., Mengel, M., Uzonyi, B., Strobel, S., Zipfel, P.F., Jozsi, M. 2009, "Autoimmune forms of thrombotic microangiopathy and membranoproliferative glomerulonephritis: Indications for a disease spectrum and common pathogenic principles". *Molecular immunology*, vol. 46, no. 14, pp. 2801-2807.
- Sniderman, A.D., and Cianflone, K. 1994, "The adipsin-ASP pathway and regulation of adipocyte function". *Annals of Medicine*, vol. 26, no. 6, pp. 388-93.

- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., Arner, P. 2008, "Dynamics of fat cell turnover in humans". *Nature*, vol. 453, no. 7196, pp. 783-787.
- Straub, B.K., Gyoengyoesi, B., Koenig, M., Hashani, M., Pawella, L.M., Herpel, E., Mueller, W., Macher-Goeppinger, S., Heid, H., Schirmacher, P. 2013, "Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation". *Histopathology*, vol. 62, no. 4, pp. 617-631.
- Strobel, S., Zimmering, M., Papp, K., Prechl, J., Jozsi, M. 2010, "Anti-factor B autoantibody in dense deposit disease", *Molecular immunology*, vol. 47, no. 7-8, pp. 1476-1483.
- Sztalryd, C., Brasaemle, D.L. 2017, "The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis". *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1862, no. 10 Pt B, pp. 1221-1232.
- Tansey, J.T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D.L., Zee, J.V., Gavrilova, O., Reitman, M.L., Deng, C.X., Li, C., Kimmel, A.R., Londos, C. 2001, "Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 11, pp. 6494-6499.
- Thiam, A.R., Farese, R.V. Jr., Walther, T.C. 2013, "The biophysics and cell biology of lipid droplets". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, no. 12, pp. 775-786.
- Trayhurn, P. 2013, "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity". *Physiological Reviews*, vol. 93, no. 1, pp. 1-21.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K.,

- Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F. 2015, "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome". *Science*, vol. 347, no. 6220, pp. 1260419.
- Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Cianflone, K., Degerman, E., Hoffstedt, J., Nilsell, K., Sniderman, A., Arner, P. 1999, "Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation stimulating protein and insulin". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 26, pp. 18243-18251.
- Van Loan, M.D. 1996, "Body fat distribution from subcutaneous to intraabdominal: a perspective". *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 64, no. 5, pp. 787-788.
- Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., Teule, G.J. 2009, "Cold-activated brown adipose tissue in healthy men". *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 15, pp. 1500-1508.
- Vasilev, V.V., Noe, R., Dragon-Durey, M.A., Chauvet, S., Lazarov, V.J., Deliyska, B.P., Fremeaux-Bacchi, V., Dimitrov, J.D., Roumenina, L.T. 2015, "Functional Characterization of Autoantibodies against Complement Component C3 in Patients with Lupus Nephritis", *Journal of Biological Chemistry*, vol 290, no. 42, pp. 25343-25355
- Vergani, D., Larcher, V.F., Davies, E.T., Wells, L., Nasaruddin, B.A., Mieli-Vergani, G., Mowat, A.P. 1985, "Genetically determined low C4: a predisposing factor to autoimmune chronic active hepatitis". *Lancet*, vol. 10, no. 8450, pp. 294-298.
- Walther, T.C., Chung, J., Farese, R.V. Jr. 2017, "Lipid Droplet Biogenesis". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 33, pp. 491-510.
- Walther, T.C., Farese, R.V. Jr. 2012, "Lipid droplets and cellular lipid metabolism". *Annual Review of Biochemistry*, vol. 81, pp. 687-714.
- Wang, H., Hu, L., Dalen, K., Dorward, H., Marcinkiewicz, A., Russell, D., Gong, D., Londos, C., Yamaguchi, T., Holm, C., Rizzo, M.A., Brasaemle, D., Sztalryd, C. 2009, "Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein

- phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 46, pp. 32116-32125.
- Wells, J.C. 2007, "Sexual dimorphism of body composition". *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 21, no. 3, pp. 415-430.
- White, R.T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B.S., Lowell, B.B., Usher, P., Flier, J.S., Spiegelman, B.M. 1992, "Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 13, pp. 9210-9213.
- Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C., Farese, R.V. Jr. 2014, "Lipid droplet biogenesis". *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 29, pp. 39-45.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J.T., Krahmer, N., Gould, T.J., Uchida, A., Cheng, J.X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K.K., Coleman, R.A., Bewersdorf, J., Farese, R.V. Jr., Walther, T.C. 2013, "Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets". *Developmental cell*, vol. 24, no. 4, pp. 384-399.
- Wolins, N.E., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., Bensch, K.G., Bickel, P.E. 2003, "Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 39, pp. 37713-37121.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H. 2003, "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance". *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1821-1830.
- Xu, S., Zhang, X., Liu, P. 2017, "Lipid droplet proteins and metabolic diseases". *Biochimica et Biophysica Acta*, pii: S0925-4439(17)30245-4. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.07.019. [Epub ahead of print]
- Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F., Osumi, T. 2006, "MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 20, pp. 14232-14240.



- Yang, Y., Lu, H.L., Zhang, J., Yu, H.Y., Wang, H.W., Zhang, M.X., Cianflone, K. 2006, "Relationships among acylation stimulating protein, adiponectin and complement C3 in lean vs obese type 2 diabetes". *International Journal of Obesity (Lond)*, vol. 30, no. 3, pp. 439-446.
- Yasruel, Z., Cianflone, K., Sniderman, A.D., Rosenbloom, M., Walsh, M., Rodriguez, M.A. 1991, "Effect of acylation stimulating protein on the triacylglycerol synthetic pathway of human adipose tissue". *Lipids*, vol. 26, no. 7, pp. 495-499.
- Yu, H., Yang, Y., Zhang, M., Lu, H., Zhang, J., Wang, H., Cianflone, K. 2006, "Thyroid status influence on adiponectin, acylation stimulating protein (ASP) and complement C3 in hyperthyroid and hypothyroid subjects". *Nutrition & Metabolism (Lond)*, vol. 3, pp. 13.
- Yu, W., Bozza, P.T., Tzizik, D.M., Gray, J.P., Cassara, J., Dvorak, A.M., Weller, P.F. 1998, "Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies". *The American Journal of Pathology*, vol. 152, no. 3, pp. 759-769.
- Zhai, W., Xu, C., Ling, Y., Liu, S., Deng, J., Qi, Y., Londos, C., Xu, G. 2010, "Increased lipolysis in adipose tissues is associated with elevation of systemic free fatty acids and insulin resistance in perilipin null mice". *Hormone and Metabolic Research*, vol. 42, no. 4, pp. 247-253.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. 1994, "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue". *Nature*, vol. 372, no. 6505, pp. 425-432.
- Ziegler, L. 1928, "Lipodystrophies: report of seven cases". *Brain*, vol. 51, no. 2, pp. 145-167.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R. 2004, "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase". *Science*, vol. 306, no. 5700, pp. 1383-1386.

# **ANEXOS**

## ANEXO I

Tabla 1. Características básicas de las proteínas de la familia PAT.

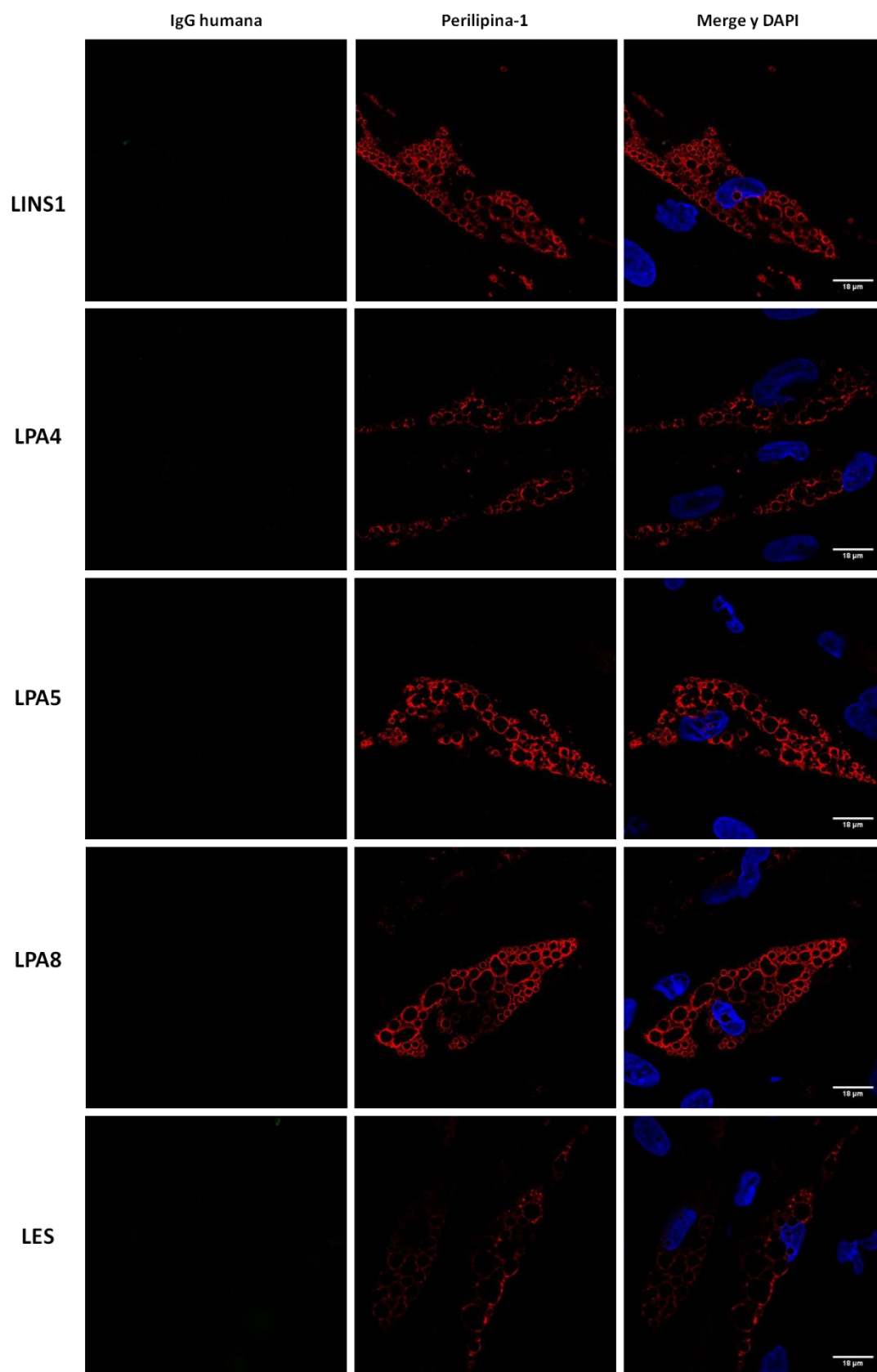
Proteínas	Otras nomenclaturas	Principal sitio de expresión	Otros sitios de expresión	Función
PLIN1	Perilipina A	Tejido adiposo blanco	Tejido adiposo pardo	-Lipólisis estimulada -Estabilización de gotas lipídicas de gran tamaño
PLIN2	ADRP ADFP Adipofilina	Hígado	-Preadipocitos -Macrófagos -Sebocitos -Epitelio de la glándula mamaria -Células de coriocarcinoma -Ubícuo	-Adipogénesis -Generación de gotas lipídicas de pequeño tamaño -Estabilización de gotas lipídicas
PLIN3	TIP47	Ubícuo	-Músculo esquelético -Neutrófilos, mastocitos -Epitelio retinal pigmentario -Sebocitos	-Estabilización de gotas lipídicas -Producción de PGE <sub>2</sub> -Tráfico vesicular intracelular
PLIN4	S3-12	Tejido adiposo blanco	-hMSC (durante la diferenciación) -Músculo esquelético	Adipogénesis
PLIN5	MLPD OXPAT PAT-1	-Músculo cardíaco -Tejido adiposo pardo -Músculo esquelético	-Células β de los islotes pancreáticos -Células hepáticas estrelladas	-Estabilización de gotas lipídicas -Suministro de ácidos grasos a la mitocondria

Abreviaturas: PLIN, perilipina; hMSC, células mesenquimales humanas; PGE<sub>2</sub>, Prostaglandina

**Tabla 2. Clasificación y principales características de las lipodistrofias congénitas**  
(Adaptada de Lightbourne y Brown, 2017)

		Gen	Función principal
<b>Lipodistrofia generalizada congénita</b>	Tipo 1 (MIM# 608594)	<i>AGPAT2</i>	Enzima que juega un papel fundamental en la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos
	Tipo 2 (MIM# 269700)	<i>BSCL2</i>	Está implicada en la fusión de las gotas lipídicas y la diferenciación adipogénica
	Tipo 3 (MIM# 612526)	<i>CAVI</i>	Componente de las caveolas implicado en la translocación de ácidos grasos y otros lípidos hacia las gotas lipídicas
	Tipo 4 (MIM# 613327)	<i>PTRF</i>	Implicado en la biogénesis de las caveolas, regulando la expresión de las caveolinas 1 y 3
<b>Lipodistrofia parcial familiar</b>	Tipo 1 (MIM# 608600)	Desconocido	
	Tipo 2 (MIM# 151660)	<i>LMNA</i>	Componente estructural de la envoltura nuclear
	Tipo 3 (MIM# 604367)	<i>PPARG</i>	Regulador principal de la diferenciación del adipocito
	Tipo 4 (MIM# 613877)	<i>PLIN1</i>	Componente estructural de la gota lipídica, participa en la regulación de la lipólisis
	Tipo 5 (MIM# 615238)	<i>CIDEA</i>	Componente estructural de la gota lipídica, participa en la regulación de la lipólisis
	Tipo 6 (MIM# 615980)	<i>HSL</i>	Regulación de la lipólisis

Abreviaturas: *AGPAT2*: 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 2; *AKT2*: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2*; *BSCL2*: lipodistrofia congénita Berardinelli-Seip 2; *CAVI*: caveolina 1; *CIDEA*: *cell death-inducing DFFA-like effector c*; *HSL*, lipasa sensible a hormonas; *LMNA*: lamina A/C; *PLIN1*: perilipina-1; *PPARG*: receptor gamma activado por el factor de proliferación de peroxisomas; *PTRF*: *polymerase I and transcript release factor/cavina-1r*.



**Figura 1. Estudios de colocalización de IgG humana y perilipina-1 en adipocitos humanos en cultivo.** La colocalización entre IgG y perilipina-1 se muestra en la superposición de imágenes (Merge, en amarillo se muestra los puntos donde existe colocalización). No se observó colocalización. En azul se muestra en núcleo teñido con DAPI. Barra de escala, 18  $\mu$ m.

## ANEXO II

### 1. ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL

- **Corvillo F**, López-Trascasa M. Acquired partial lipodystrophy and C3 glomerulopathy: Dysregulation of the complement system as a common pathogenic mechanism. *Nefrología*. 2017 Dec 23. pii: S0211-6995(17)30227-8. doi: 10.1016/j.nefro.2017.10.002. **IF**: 1.183

### 2. ARTÍCULOS NO RELACIONADOS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL

- López-Lera A, **Corvillo F**, Nozal P, Regueiro JR, Sánchez-Corral P, López-Trascasa M. Complement as a diagnostic tool. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Jan 12. pii: S1084-9521(17)30146-5. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.017. **IF**: 6.614
- Blom AM, **Corvillo F**, Magda M, Stasiłojć G, Nozal P, Pérez-Valdivia MÁ, Cabello-Chaves V, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M, Okrój M. Testing the activity of complement convertases in serum/plasma for diagnosis of C4NeF-mediated C3 glomerulonephritis. *J Clin Immunol*. 2016;36(5):517-27. **IF**: 3.253
- **Corvillo F**, Bravo García-Morato M, Nozal P, Garrido S, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S, López-Trascasa M. Serum properdin consumption as a biomarker of C5 convertase dysregulation in C3 glomerulopathy. *Clin Exp Immunol*. 2016; 184(1):118-25. **IF**: 3.410